

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR
UNGU (*Ipomoea batatas L.Lam*) TERHADAP
EKSPRESI TNF- α DAN HISTOPATOLOGI
DUODENUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *INFLAMMATORY BOWEL*
DISEASE HASIL INDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh :

FEBRINA NIKEN LARASATI
145130101111030



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR
UNGU (*Ipomoea batatas L. Lam*) TERHADAP
EKSPRESI TNF- α DAN HISTOPATOLOGI
DUODENUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL *INFLAMMATORY BOWEL*
DISEASE HASIL INDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh :

FEBRINA NIKEN LARASATI
145130101111030



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)
terhadap Ekspresi TNF- α dan Histopatologi Duodenum Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease*
Hasil Induksi Indometasin**

**Oleh :
FEBRINA NIKEN LARASATI
145130101111030**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 06 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19810504 200501 1 001

drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Febrina Niken Larasati

NIM : 145130101111030

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) terhadap Ekspresi TNF- α dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* Hasil Induksi Indometasin

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 09 Agustus 2018

Yang menyatakan,

(Febrina Niken Larasati)

NIM. 145130101111030

**Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)
terhadap Ekspresi TNF- α dan Histopatologi Duodenum Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease*
Hasil Induksi Indometasin**

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan istilah umum yang digunakan untuk menggambarkan inflamasi kronis yang melibatkan semua saluran cerna. Indometasin menjadi salah satu pemicu terjadinya IBD. Pemberian indometasin dapat mengakibatkan penurunan produksi prostaglandin oleh COX sebagai barier mukosa pada duodenum yang dapat memicu terjadinya inflamasi kronis dan peningkatan ROS. Produksi ROS yang berlebihan dapat meningkatkan ekspresi sitokin TNF- α . TNF- α akan mengaktivasi neutrofil yang akan bermigrasi ke jaringan duodenum yang mengalami inflamasi. Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) memiliki kandungan senyawa aktif flavonoid yang berpotensi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan gambaran histopatologi duodenum hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) IBD. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 8-12 minggu dengan berat sekitar 150-200 gram yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok terapi dosis 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB. Ekspresi TNF- α diamati dengan metode imunohistokimia dan dianalisa secara kuantitatif menggunakan *software immunoratio* kemudian data ekspresi dianalisa statistik dengan *one way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tukey* dengan $\alpha = 5\%$. Gambaran histopatologi duodenum diamati dengan mikroskop dan dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) dengan dosis 800 mg/kg BB dapat menurunkan ekspresi TNF- α dan mampu memperbaiki kerusakan gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*), duodenum, TNF- α .

Effect of Ethanol Extract of Purple Sweet Potato Leaves (*Ipomoea batatas* L.Lam) on TNF- α Expression and Duodenum Histopathology of Rats (*Rattus norvegicus*) as Model Inflammatory Bowel Disease Induced by Indomethacin

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a general term used to describe chronic inflammation involving all gastrointestinal tracts. Indomethacin became one of the etiology of IBD. Giving indomethacin may lead to decrease prostaglandin production by COX as a mucosa barrier in the duodenum that can lead to chronic inflammation and increased ROS production. Excessive ROS production may increase TNF- α cytokine expression. TNF- α will activate neutrophils that will migrate to the inflamed duodenal tissue. The ethanol extract of purple sweet potato leaves (*Ipomoea batatas* L. Lam) has the potency of flavonoid active compound which has potential as antiinflammatory and antioxidant. This study aims to determine the effect of ethanol extract therapy of purple sweet potato leaves on the expression of *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) and duodenum histopathology of rat (*Rattus Norvegicus*) as animal model IBD. This study used a Rancangan Acak Lengkap (RAL) with male rat (*Rattus Norvegicus*) strain *Wistar* of 8-12 weeks old with weight of 150-200 gram divided into 5 groups: negative control group, positive control group, and group of therapeutic dose of 600 mg/kg BW, 700 mg/kg BW, and 800 mg/kg BW. TNF- α expression was observed by immunohistochemical methode and analyzed quantitatively using *immunoratio software* then expression data were analyzed statistically with *one way ANOVA* followed by *Tukey* test with $\alpha = 5\%$. The description of duodenal histopathology was observed with a microscope and analyzed descriptively. The results showed that giving ethanol extract of purple sweet potato leaf (*Ipomoea batatas* L. Lam) with dose of 800 mg/kg BW can decrease TNF- α expression and able to repair the histopathologic damage of rat duodenum (*Rattus norvegicus*).

Key words : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), purple sweet potato leaves (*Ipomoea batatas* L. Lam), duodenum, TNF- α .

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT karena atas rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap Ekspresi TNF- α dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* Hasil Induksi Indometasin” ini dapat selesai disusun. Penulisan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan skripsi. Tanpa bantuan, do’a, dan semangat dari berbagai pihak, sangatlah tidak mudah menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih terutama kepada:

1. Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D, selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, dan waktu selama penulisan skripsi.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech., selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, dan waktu selama penulisan skripsi.
3. drh. Ajeng Aeka, M.Sc., selaku dosen penguji I atas kesempatan, nasihat, dan arahnya kepada penulis.
4. drh. Mira Fatmawati, M.Si., selaku dosen penguji II atas kesempatan, nasihat, dan arahnya kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
6. Seluruh staf dan karyawan FKH UB yang telah membantu proses administrasi dalam menyelesaikan skripsi.
7. Keluarga penulis, Ayahanda Achmad Romadhon, Ibunda Wahyuningsih Yuwono, dan Kakakku tercinta Yulia Niken Saraswati yang tanpa henti memberikan do’a, semangat, dan motivasi.
8. Sahabatku tercinta, Khairiza, Agnesya, dan Restifa atas semangat dan dukungannya.
9. Teman-teman kelompok penelitian “*Ipomoea batatas*”; Restifa, Davinci, Desy, dan Hanun yang selalu membantu dan saling mendukung satu sama lain.
10. Teman-teman seperjuangan mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan khususnya untuk BRAVE 2014B yang telah menjadi keluarga baru selama

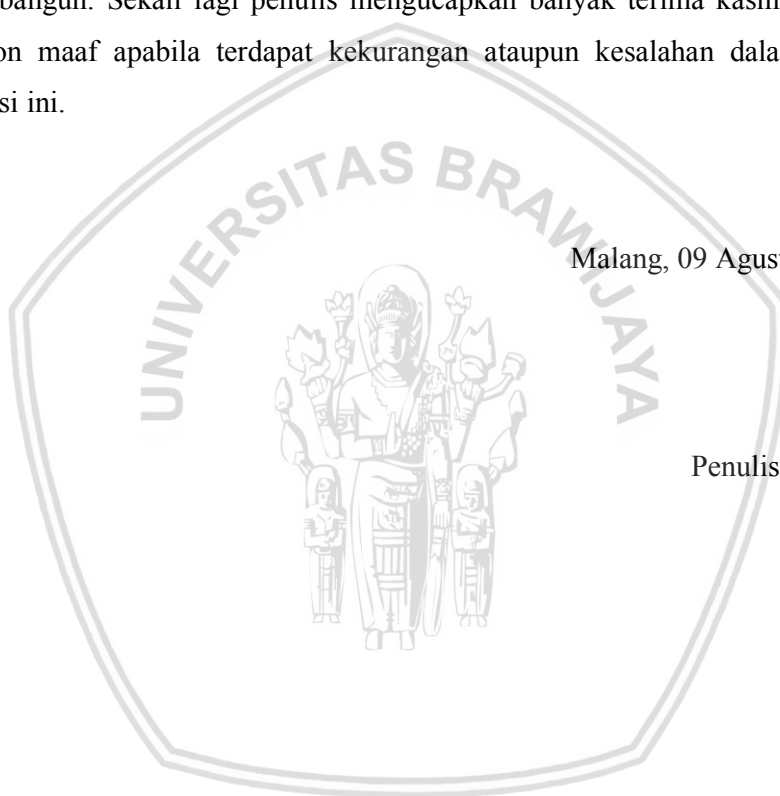
proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi dorongan untuk mencapai kesuksesan.

11. Penghuni kosan Watugong yang senantiasa menyemangati dan mendukung dalam pengerjaan skripsi.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan mengingat keterbatasan pengetahuan dan referensi yang penulis miliki. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Sekali lagi penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penulis mohon maaf apabila terdapat kekurangan ataupun kesalahan dalam penulisan skripsi ini.

Malang, 09 Agustus 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Inflammatory Bowel Disease</i>	6
2.2 Tikus Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i>	9
2.3 Indometasin.....	11
2.4 Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>).....	13
2.5 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α).....	15
2.6 Duodenum Tikus.....	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konseptual.....	20
3.2 Hipotesis Penelitian.....	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
4.2 Sampel Penelitian.....	23
4.3 Rancangan Penelitian.....	24
4.4 Variabel Penelitian.....	26
4.5 Alat dan Bahan.....	26
4.5.1 Alat.....	26
4.5.2 Bahan.....	26
4.6 Tahapan Penelitian.....	27
4.7 Prosedur Kerja.....	28
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	28
4.7.2 Persiapan Hewan Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> dengan Induksi Indometasin.....	29
4.7.3 Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>).....	30
4.7.4 Tatalaksana Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>).....	31

4.7.5 Pengambilan Sampel Organ Duodenum.....	31
4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum.....	32
4.7.7 Pewarnaan Preparat Histopatologi Duodenum dengan Hematoksilin Eosin (HE).....	36
4.7.8 Pengamatan Gambaran Histopatologi Duodenum.....	36
4.7.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHK).....	37
4.7.10 Pengamatan Ekspresi TNF- α Duodenum dengan metode Imunohistokimia (IHK).....	38
4.8 Analisis Data.....	38
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
5.1 Kondisi Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Pasca Induksi Indometasin.....	39
5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>) terhadap Ekspresi TNF- α pada Duodenum Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> Hasil Induksi Indometasin.....	41
5.3 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>) terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> Hasil Induksi Indometasin.....	47
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
6.1 Kesimpulan.....	52
6.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan kelompok penelitian.....	24
4.2 Kelompok perlakuan.....	25
5.1 Rata-rata ekspresi TNF- α duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mekanisme <i>Inflammatory Bowel Disease</i>	8
2.2 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	10
2.3 Daun ubi jalar ungu.....	14
2.4 Villi duodenum pada tikus tinggi dan mirip daun.....	18
2.5 Saluran gastrointestinal tikus.....	19
2.6 Struktur normal histologi duodenum.....	19
3.1 Skema kerangka konseptual penelitian.....	20
5.1 Konsistensi feses tikus kelompok KP cair (A) dan feses tikus kelompok KN padat (B).....	39
5.2 Hemoragi suffusive pada duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	41
5.3 Gambaran imunohistokimia TNF- α salah satu dari lima lapang pandang pada duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) model IBD hasil induksi indometasin dengan perbesaran 400x dan 1000x.....	42
5.4 Histologi duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) kontrol negatif dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x.....	48
5.5 Histopatologi duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) kontrol positif dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x.....	48
5.6 Histopatologi duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok terapi dosis 600 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x.....	48
5.7 Histopatologi duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok terapi dosis 700 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x.....	49
5.8 Histopatologi duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) kelompok terapi dosis 800 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Komisi Etik Penelitian.....	59
2. Kerangka operasional.....	60
3. Langkah kerja penelitian.....	61
4. Perhitungan dosis terapi ekstrak daun ubi jalar ungu.....	66
5. Data berat badan sampel tikus penelitian IBD.....	69
6. Data ekspresi TNF- α hasil <i>immunoratio software</i>	70
7. Hasil statistika analisa ekspresi TNF- α	71



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	persentase
µg	mikrogram
µl	mikroliter
µm	mikrometer
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
BB	berat badan
BW	body weight
cm	sentimeter
COX	<i>cyclooxygenase</i>
DAB	<i>Diamino Benzidine</i>
DMBI	<i>desmetildeschloro-benzoyl-indomethacin</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
g	gram
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
HE	Hematoksin Eosin
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IHK	Imunohistokimia
IκB	inhibitor NF-κB
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
kg	kilogram
l	liter
mg	miligram
ml	mililiter
NaCl	Natrium klorida
NF-κB	<i>Necrosis Factor Kappa-B</i>
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>
O ₂	Oksigen
°C	derajat Celcius
OH	Hidroksida
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PGE	Prostaglandin
PMN	Polimorfonuklear
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	<i>Strep avidin-Horse Radin Peroxidase</i>
Th	T helper
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Inflammatory Bowel Disease (IBD) menggambarkan kondisi peradangan saluran cerna kronik dan idiopatik (Firmansyah, 2013). Penyakit ini secara primer dapat dibagi menjadi penyakit Crohn dan kolitis ulseratif. Penyakit Crohn adalah penyakit inflamasi usus di sepanjang saluran cerna dan sering menyebar ke dalam jaringan yang terkena sedangkan kolitis ulseratif menimbulkan inflamasi berkepanjangan pada bagian tertentu saluran cerna. Kolitis ulseratif menyerang lapisan paling dalam dari kolon dan rektum dan ditandai oleh inflamasi mukosa difus yang terbatas di kolon (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Duodenum merupakan salah satu segmen pada usus halus. Duodenum dipilih sebagai parameter dikarenakan duodenum berperan dalam pencernaan dan absorpsi awal dari usus halus.

Selain pada manusia, IBD juga dapat terjadi pada hewan, contohnya anjing (Kathrani *et al.*, 2012). Pada anjing, IBD ditandai dengan adanya gejala gastrointestinal kronis yang secara histologis dibuktikan dengan adanya peradangan pada lamina propria usus halus (Allenspach *et al.*, 2007). Peradangan yang terjadi dapat mempengaruhi daerah usus antara duodenum dan kolon, namun pada anjing 75% proses inflamasi dilokalisasi di bagian duodenum (German *et al.*, 2003). Penyebab terjadinya IBD belum sepenuhnya dijelaskan, namun diyakini dapat terjadi karena adanya interaksi kompleks antara faktor bakteri dan lingkungan, kecenderungan genetik, efek samping obat-obatan tertentu dan kekebalan usus yang menurun (Simpson and Jergens, 2011).

Indometasin merupakan salah satu obat *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID) yang menjadi salah satu pemicu terjadinya IBD. Indometasin akan menghambat enzim *cyclooxygenase* 1 (COX-1) dan *cyclooxygenase* 2 (COX-2), tetapi dianggap lebih efektif menghambat COX-1. COX-1 berperan dalam pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barier usus. Hal ini dapat memicu terjadinya inflamasi pada usus bagian duodenum karena perlindungan terhadap mukosa barier usus berkurang (Takeuchi *et al.*, 2003). Inflamasi yang berlebihan dapat meningkatkan kadar TNF- α . Hal ini menandakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas makrofag yang berlebihan untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi (Tjahjani dkk., 2016). Pada tikus, asupan oral indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan perdarahan pada usus (Aulanni'am *et al.*, 2012).

Selama ini, pengobatan penyakit IBD dilakukan dengan pemberian obat-obatan kortikosteroid seperti prednisone, prednisolone dan budesonide (Defarges, 2018). Efek terapeutik dari kortikosteroid bisa paralel dengan efek samping terutama jika pemberian dengan jangka waktu yang lama (Purba, 2007). Pemberian kortikosteroid dosis tinggi dalam jangka panjang dapat menyebabkan terjadinya penurunan masa otot skelet serta timbulnya osteoporosis (Subronto dan Tjahajati, 2007).

Penggunaan tanaman herbal untuk terapi IBD menjadi salah satu alternatif terapi karena dinilai lebih aman dibandingkan dengan obat-obatan kimia dilihat dari segi toksisitas dan efek samping yang ditimbulkan. Salah satu tanaman herbal yang dapat digunakan untuk terapi IBD yaitu daun ubi jalar ungu (*Ipomoea*

batatas L. Lam). Daun ubi jalar ungu mengandung senyawa polifenol berupa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan (Sulistiyowati dan Rachmani, 2009). Bagian daun ubi jalar ungu memiliki kandungan antioksidan dan komponen fitokimia yang lebih tinggi dibandingkan bagian umbinya. Kandungan flavonoid dalam daun ubi jalar ungu yang tinggi mencapai $263,5 \pm 43,5 \mu\text{g/g}$ (Hue, 2012). Selain berfungsi sebagai antioksidan, kandungan flavonoid pada daun ubi jalar ungu juga terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi (Riansyah dkk., 2015).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi duodenum pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diinduksi indometasin, kemudian diterapi dengan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) berpengaruh terhadap perubahan ekspresi TNF- α pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin?
2. Apakah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) berpengaruh terhadap gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan pada subbab sebelumnya, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* sebanyak 20 ekor berusia 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 859-KEP-UB (Lampiran 1).
2. Induksi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dilakukan dengan pemberian indometasin pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberikan hanya satu kali secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB (Aulanni'am, 2012).
3. Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) yang digunakan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) kota Malang, Jawa Timur.
4. Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) dilakukan dengan metode maserasi yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dosis terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) yang diberikan yaitu 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB secara per oral menggunakan sonde lambung selama 7 hari berturut-turut.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan histopatologi pada duodenum. Ekspresi TNF- α diamati dengan metode imunohistokimia (IHK) kemudian data yang diperoleh dari pengukuran kadar ekspresi TNF- α pada sampel dideskripsi dengan *software immunoratio* dan

dianalisa dengan *one way* ANOVA dilanjutkan uji *Tukey* dengan $\alpha = 5\%$. Gambaran histopatologi diamati dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) untuk melihat kerusakan vili dan infiltrasi sel-sel radang kemudian dianalisa secara deskriptif kualitatif pada kerusakan yang diamati.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) terhadap perubahan ekspresi TNF- α pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) terhadap gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat membuktikan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) mampu menekan inflamasi pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin berdasarkan ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi duodenum sehingga ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan kasus IBD pada duodenum.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

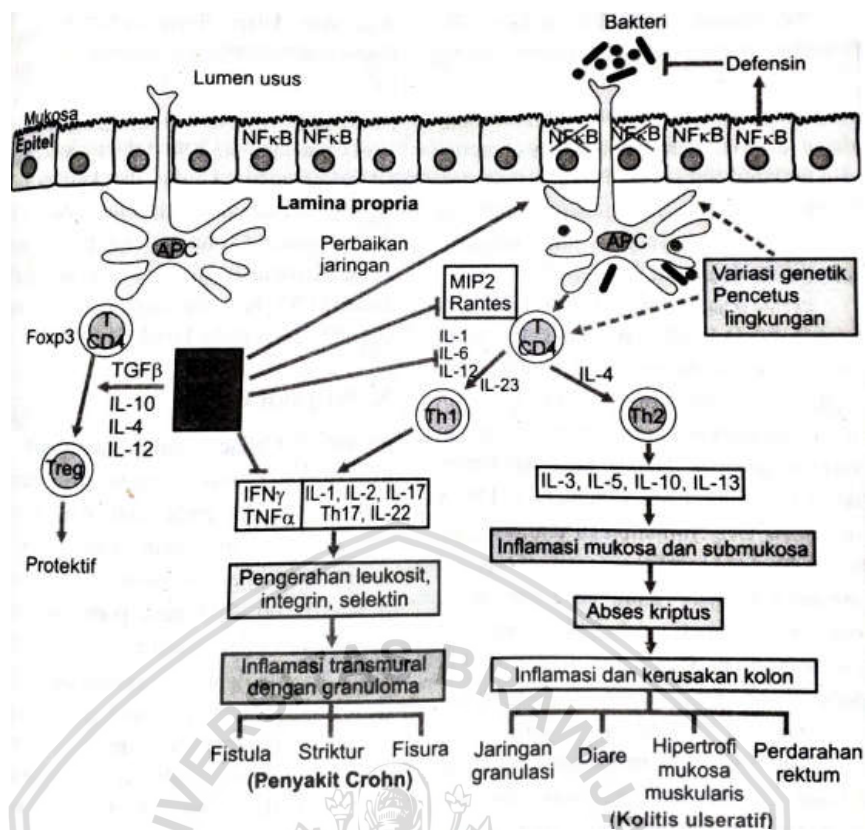
2.1 *Inflammatory Bowel Disease*

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan istilah umum yang digunakan untuk menggambarkan kelainan idiopatik yang berhubungan dengan peradangan pada gastrointestinal (Yosy dan Salwan, 2014). IBD melibatkan inflamasi kronis pada semua saluran cerna. Penyakit ini secara primer dapat dibagi menjadi penyakit Crohn (PC) dan kolitis ulseratif (KU). Penyakit Crohn adalah penyakit inflamasi usus di sepanjang saluran cerna dan sering menyebar ke dalam jaringan yang terkena. Keadaan ini dapat menyebabkan nyeri abdomen, diare berat bahkan malnutrisi. Kolitis ulseratif adalah penyakit inflamasi usus yang menimbulkan inflamasi berkepanjangan pada bagian tertentu saluran cerna. Gejala timbul secara bertahap, jarang mendadak. Penyakit ini menyerang lapisan paling dalam dari kolon dan rektum dan ditandai oleh inflamasi mukosa difus yang terbatas di kolon. Gejala PC meliputi diare, nyeri abdomen, dan kehilangan berat badan sedangkan KU berupa diare, nyeri abdomen, hematochezia, dan tenesmus rektal (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Pemeriksaan awal IBD biasanya berupa LED, CRP, anemia, kekurangan cairan dan tanda malnutrisi. Pemeriksaan feses dianjurkan untuk mencari peran mikroorganisme (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Secara laboratorik, tidak ada parameter yang spesifik untuk IBD. Umumnya yang digunakan adalah parameter penanda inflamasi secara umum seperti laju endap darah (LED) atau *C-reactive protein* (CRP). Pada PC, kadar CRP serum berkorelasi positif dengan aktivitas penyakit dan dengan penanda inflamasi lainnya sesuai dengan indeks

aktivitas PC. Peningkatan kadar CRP > 45mg/L pada pasien IBD dapat membantu klinisi untuk mengambil keputusan perlunya dilakukan kolektomi. Pemeriksaan feses dapat membantu penentuan apakah peradangan disebabkan oleh infeksi atau non-infeksi. Pemeriksaan serologi dapat membantu menegakkan diagnosis IBD dan dapat membedakan antara KU dan PC yakni dengan pemeriksaan pANCA (*perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody*) untuk pasien KU dan anti-*saccharomyces cerevisiae antibody* (ASCA) untuk pasien PC. p-ANCA ditemukan pada 50-67% kasus KU sedangkan ASCA lebih sering dijumpai pada PC yakni sekitar 40 sampai 60% (Firmansyah, 2013). Diagnosis banding biasanya didasarkan atas pemeriksaan endoskopi dan radiologis dan atau pemeriksaan biokimiawi serta biopsi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

IBD disebabkan oleh aktivasi abnormal sistem imun pada usus yang menyebabkan inflamasi pada usus tanpa adanya penyebab yang jelas. Sistem imun pada penderita IBD terjadi secara abnormal dan kronis yang menyebabkan inflamasi dan ulserasi saluran cerna. Beberapa faktor lain yang diduga berpengaruh yaitu faktor genetik dan lingkungan (Yosi dan Salwan, 2014). Selain itu, penggunaan *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID) seperti indometasin juga dapat menjadi penyebab terjadinya IBD (Takeuchi *et al.*, 2003). Penggunaan NSAID dapat menghambat kerja dari enzim *cyclooxygenase* 1 (COX-1) dan *cyclooxygenase* 2 (COX-2) yang akan menyebabkan penghambatan pembentukan prostaglandin yang merupakan faktor protektif usus sehingga mengakibatkan permeabilitas usus meningkat. Hal ini dapat menyebabkan mudahnya invasi bakteri patogen pada permukaan usus sehingga memicu terjadinya inflamasi (Kaser *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Mekanisme *Inflammatory Bowel Disease* (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014)

Antigen-presenting cell (APC) akan mempresentasikan antigen luminal pada mukosa ke sel T. Sel T akan berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel T efektor dan memori apabila terpapar antigen spesifik yang dipresentasikan APC. Sel T efektor CD4⁺ dibedakan dalam beberapa subset atas dasar sitokin yang diproduksinya. Sel T helper (Th) yang disebut juga sel *Tinducer* merupakan subset sel T yang diperlukan dalam induksi respon imun terhadap antigen asing (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014). Pengaktifan sel Th akan menghasilkan sitokin yang berperan pada epitel usus secara langsung (**Gambar 2.1**). Peningkatan produksi sitokin proinflamasi terjadi terutama pada aktivasi

makrofag di lamina propria (Yamada, 2005). Makrofag akan melepaskan *Reactive Nitrogen Species* (ROS) dan *Reactive Oxygen Species* (RNS) (Burstein and Fearon, 2008). Menurut Campbell and Perkins (2006), apabila produksi ROS di dalam sel berlebihan akan menyebabkan aktivasi *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) dan fosforilasi inhibitor NF- κ B (I κ B). I κ B selanjutnya akan diagregasi oleh sistem proteosome. Oleh karena tidak adanya inhibitor bagi NF- κ B, maka NF- κ B berpindah menuju ke nukleus dan mengekspresikan kemokin dan sitokin (TNF- α). Produksi TNF- α yang berlebih pada sel akan menyebabkan adanya agregasi dan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease yang menyebabkan kerusakan jaringan.

2.2 Tikus Model *Inflammatory Bowel Disease*

Hewan model yang digunakan untuk penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar*. Tikus (*Rattus norvegicus*) atau disebut juga dengan tikus albino (tikus putih) memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai hewan uji penelitian yaitu perkembangbiakannya cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak serta memiliki temperamen yang baik. Hal ini akan mempermudah dalam pengamatan. Tikus putih juga memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan memiliki ekor yang lebih panjang dibandingkan dengan badannya (**Gambar 2.2**) (Akbar, 2010).



Gambar 2.2 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010)

Klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut (Akbar, 2010):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih galur *Wistar* memiliki ciri khas yaitu kepala lebar, telinga panjang, memiliki ekor yang panjangnya tidak melebihi panjang tubuhnya, memiliki rambut berwarna putih, mata berwarna merah dan kecil, moncong tumpul, serta memiliki telinga yang kecil. Tikus ini memiliki sifat pemalu dan gugup jika ada sesuatu yang baru, pemakan segalanya (menyukai daging dan kacang) dan ahli berenang. Jumlah kebutuhan konsumsi pakan untuk tikus dewasa adalah 15-30 g/hari sedangkan untuk konsumsi minumnya sebanyak 20-45 ml/hari (Krinke, 2000).

Berdasarkan penelitian Aulanni'am *et al.* (2012), dosis pemberian indometasin untuk dapat menghasilkan duodenum mengalami IBD sebanyak 15 mg/kg BB. Indometasin diberikan satu kali secara peroral dan diinkubasi selama 24 jam. Kondisi IBD pada tikus dapat terjadi setelah 24 jam induksi indometasin.

2.3 Indometasin

Indometasin termasuk dalam obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID). NSAID adalah suatu kelas obat yang dapat menekan inflamasi melalui inhibisi enzim *cyclooxygenase* (COX). Antiinflamasi nonsteroid menghambat enzim COX sehingga konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin terganggu. Efek pentingnya yaitu dalam mengurangi rasa sakit. NSAID dapat menimbulkan masalah penyakit gastrointestinal yang serius (Depkes, 2006). Indometasin merupakan turunan dari asam heteroarilasetat yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan analgesik-antipiretik (Boyer *et al.*, 2009). Indometasin memberikan efek analgesik yang cukup baik dan nyata akan tetapi memiliki risiko toksisitas saluran cerna yang besar, dapat mengakibatkan gangguan fungsi ginjal, ulkus peptikum, dan perdarahan pasca bedah (Fajriani, 2008).

Prinsip mekanisme NSAID sebagai analgesik adalah blokade sintesa prostaglandin melalui hambatan COX-1 dan COX-2 dengan mengganggu lingkaran *cyclooxygenase* (Depkes, 2006). COX-1 selalu ada di berbagai jaringan tubuh dan berfungsi dalam mempertahankan fisiologi tubuh seperti produksi mukus di gastrointestinal. Akan tetapi, COX-2 sebaliknya, karena merupakan enzim inducibel yang umumnya tidak terpantau di kebanyakan jaringan, tapi akan meningkat pada keadaan inflamasi atau patologik. NSAID yang bekerja sebagai

penyekat COX akan berikatan pada bagian aktif enzim, pada COX-1 dan atau COX-2, sehingga enzim ini menjadi tidak berfungsi dan tidak mampu merubah asam arakidonat menjadi mediator inflamasi prostaglandin (Fajriani, 2008).

Indometasin menjadi salah satu pemicu terjadinya IBD. Indometasin akan menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi dianggap lebih efektif menghambat COX-1. COX-1 berperan dalam pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus. Hal ini dapat memicu terjadinya infeksi oleh bakteri patogen karena perlindungan terhadap mukosa barrier usus berkurang sehingga mudah mengalami inflamasi (Takeuchi *et al.*, 2003). Inflamasi yang berlebihan dapat meningkatkan kadar TNF- α . Hal ini menandakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas makrofag yang berlebihan untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi (Tjahjani dkk., 2016).

Indometasin juga dapat memicu pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yaitu O_2^- , H_2O_2 dan OH pada mitokondria sel enterosit pada usus. Indometasin dapat menyebabkan kebocoran elektron pada rantai transport elektron sehingga menyebabkan reduksi O_2 menjadi O_2^- dan terbentuk ROS. Selain itu, ROS juga disebabkan karena oksidasi metabolit indometasin yaitu oksidasi *desmetildeschloro-benzoyl-indomethacin* (DMBI) menjadi iminokuinon dan secara tidak langsung indometasin akan memacu aktivasi makrofag dan neutrofil ke dalam jaringan yang juga dapat menginduksi ROS dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) (Aulanni'am dkk., 2011). Apabila produksi ROS di dalam sel berlebihan akan menyebabkan aktivasi *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) dan fosforilasi inhibitor NF- κ B (I κ B). I κ B selanjutnya akan diagregasi oleh

sistem proteasome. Oleh karena tidak adanya inhibitor bagi NF- κ B, maka NF- κ B berpindah menuju ke nukleus dan mengekspresikan kemokin dan sitokin (TNF- α) sehingga mengakibatkan inflamasi lokal pada jaringan duodenum usus halus (Campbell and Perkins, 2006). Pada tikus, asupan oral indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan perdarahan pada mukosa usus (Aulanni'am *et al.*, 2012).

2.4 Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)

Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) merupakan tanaman yang mudah tumbuh di daerah tropis, termasuk di Indonesia (**Gambar 2.3**) (Kusumastuty, 2015). Di Afrika, umbi ubi jalar menjadi salah satu sumber makanan pokok yang penting. Di Asia, selain dimanfaatkan umbinya, daun muda ubi jalar juga dibuat sayuran (Hambali dkk., 2014). Daun ini mengandung polifenol, flavonoid, dan karotenoid yang paling tinggi diantara sayur-sayuran lainnya sehingga memiliki kemampuan menangkap radikal bebas (Kusumastuty, 2015). Selain mengandung polifenol, flavonoid, dan karotenoid, daun ubi jalar ungu juga mengandung vitamin, mineral, antosianin, dan asam lemak esensial. Semua senyawa ini berfungsi untuk menjaga kesehatan melalui peningkatan sistem imunitas atau melalui aktivitas antioksidan dalam menangkap radikal bebas (Johnson and Pace, 2010). Menurut Riansyah dkk. (2015), daun ubi jalar ungu juga dapat digunakan sebagai bahan obat karena memiliki kandungan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas

antioksidatif flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha, 2010).

Menurut Hue (2012), bagian daun ubi jalar ungu memiliki kandungan antioksidan dan komponen fitokimia yang lebih tinggi dibandingkan bagian umbinya. Kandungan flavonoid dalam daun ubi jalar ungu yang tinggi mencapai $263,5 \pm 43,5 \mu\text{g/g}$. Selain itu, hasil penelitian Ojong *et al.* (2008) menunjukkan bahwa rata-rata kandungan flavonoid dalam persentase berat kering (% DW) pada daun ubi jalar ungu sebanyak 1,79 % DW sedangkan pada ubi 0,80 % DW.



Gambar 2.3 Daun ubi jalar ungu (Heuzé *et al.*, 2017)

Senyawa flavonoid pada ekstrak daun ubi jalar ungu juga memiliki aktivitas antiinflamasi. Terdapat beberapa aktivitas antiinflamasi dari flavonoid, diantaranya yaitu dengan melakukan penghambatan pada COX dan lipooksigenase sehingga dapat menyebabkan penghambatan sintesis leukotrien

dan prostaglandin yang dapat menyebabkan penghambatan sekresi mukus yang berfungsi untuk melindungi dinding gastrointestinal. Aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan akumulasi leukosit selama proses inflamasi akan menyebabkan penurunan respon tubuh terhadap inflamasi, penghambatan akumulasi leukosit ini karena terjadi penghambatan pada COX sehingga tromboksan akan dihambat dimana tromboksan ini akan menyebabkan modulasi leukosit. Aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan degranulasi netrofil akan mengurangi pelepasan asam arakhidonat oleh neutrofil. Aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan pelepasan histamin terjadi karena flavonoid dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast (Riansyah dkk., 2015)

2.5 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan sitokin proinflamasi. Sitokin adalah polipeptida yang diproduksi sebagai respons terhadap rangsang mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi. Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi atau perantara dalam komunikasi antarsel yang sangat poten dan aktif pada kadar yang sangat rendah (10^{-10} - 10^{-15} mol/l dapat merangsang sel sasaran). Reseptor yang diekspresikan dan afinitasnya merupakan faktor kunci respon seluler. Jadi sitokin berperan dalam aktivasi sel T, sel B, monosit, makrofag, inflamasi, dan induksi sitotoksitas (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. Sumber utama TNF- α adalah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel

NK, dan sel mast. TNF- α memiliki efek biologis sebagai berikut (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014):

- a. Pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel-sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba
- b. Memacu ekspresi molekul adhesi sel endotel vaskular untuk leukosit
- c. Merangsang makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi kemotaksis dan pengerahan leukosit
- d. Merangsang fagosit mononuklear untuk mensekresi IL-1 dengan efek seperti TNF- α

Ketika terjadi kerusakan mukosa duodenum, akan memicu terjadinya inflamasi sehingga terjadi peningkatan adesi leukosit ke permukaan endotel yang ditandai dengan adanya migrasi sel-sel mononuklear dan sel neutrofil ke lamina propria duodenum yang membebaskan sitokin TNF- α (Salagacka *et al.*, 2014). Dengan metode imunohistokimia (IHK), ekspresi TNF- α akan ditunjukkan dengan warna coklat.

2.6 Duodenum Tikus

Usus halus adalah bagian terpanjang dari saluran gastrointestinal. Panjang usus halus pada tikus 35 cm dan berperan dalam penyerapan nutrisi. Usus halus dimulai setelah spinchter pilorus dan berlanjut secara distal ke katup ileocecal. Usus halus terbagi menjadi tiga wilayah yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Masing-masing daerah usus mengandung empat lapisan yaitu mukosa (lapisan barrier epitel, lamina propria, dan muskularis mukosa), submukosa, muskularis propria, dan serosa. Permukaan mukosa ditutupi oleh lapisan tipis (0.5-1.5 mm)

dan membentuk jari yang disebut villi. Villi memaksimalkan penyerapan nutrisi dengan meningkatkan luas permukaan usus halus. Secara umum, panjang villi menurun dari duodenum ke ileum. Pada tikus, villi duodenum tinggi dan bentuknya mirip seperti daun (**Gambar 2.4**) (Treuting *et al.*, 2012).

Duodenum adalah daerah usus halus yang terletak paling proksimal setelah spinchter pilorus (**Gambar 2.5**) (Treuting *et al.*, 2012). Duodenum terdiri atas empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis longitudinal dan sirkuler, dan tunika serosa. Di lamina propria normalnya terdapat limfosit, sel plasma dan makrofag. Pada mukosa terdapat penonjolan seperti jari membentuk villi yang dipisahkan oleh kripte yang dilapisi oleh lapisan sel epitel kolumnar simpleks, dimana sebagian besar adalah enterosit dengan populasi sel mukus, sel Paneth dan neuroendokrin yang bervariasi. Pada submukosa terdapat kelenjar Brunner yang dapat digunakan untuk membedakan bagian duodenum dengan bagian usus halus yang lainnya (Scudamore, 2014). Kelenjar Brunner mengeluarkan mukus yang dapat membantu menetralkan asam lambung. Kelenjar ini merupakan satu-satunya kelenjar submukosa yang ada pada saluran pencernaan tikus (Parker and Picut, 2016).

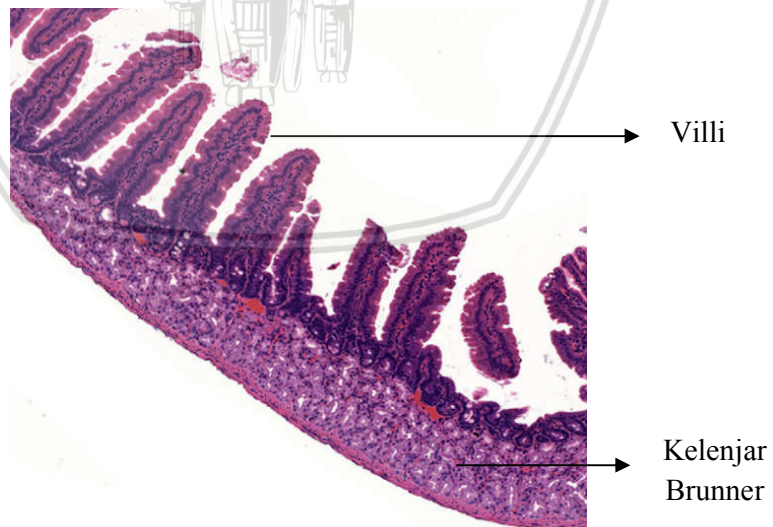
Dinding duodenum terdiri atas empat lapisan konsentris (Alley, 2008):

- 1) Lapisan paling luar yang dilapisi peritoneum, yaitu tunika serosa. Lapisan ini merupakan kelanjutan dari peritoneum, tersusun atas selapis sel-sel pipih mesothelial diatas jaringan ikat longgar dan pembuluh darah.
- 2) Lapisan muskuler disebut juga tunika muskularis yang tersusun atas serabut otot longitudinal (luar) dan sirkuler (dalam). Pleksus mesenterikus Aurbach

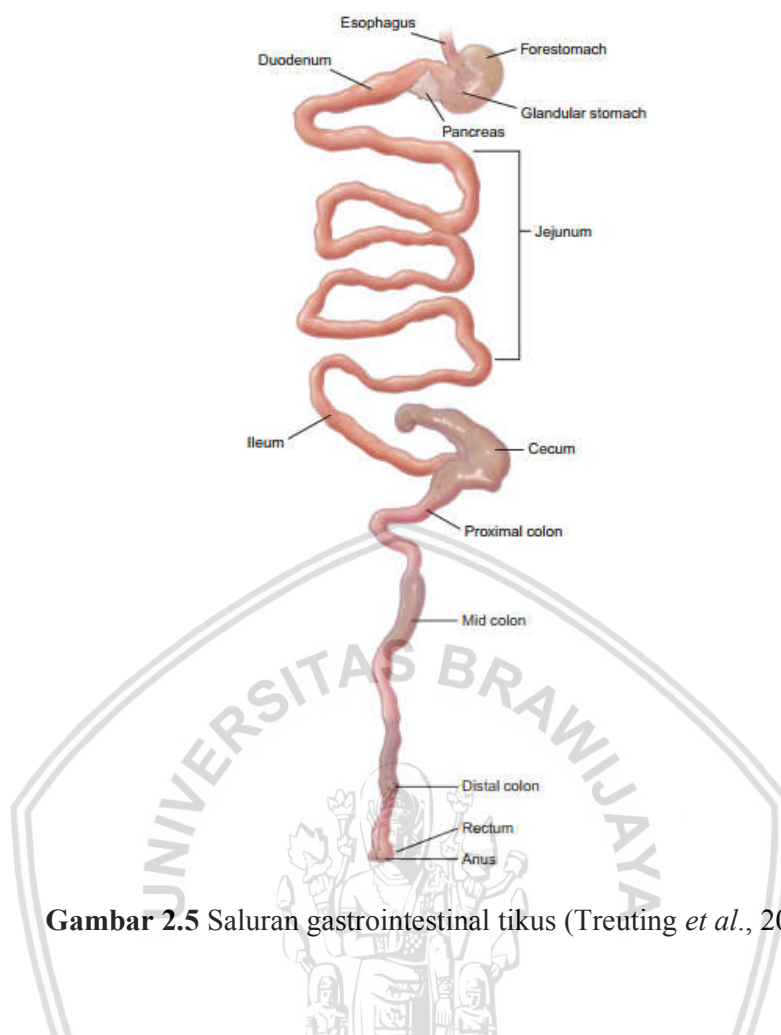
terletak diantara kedua lapisan ini dan berfungsi mengatur otot di sepanjang usus.

- 3) Lapisan selanjutnya yaitu submukosa yang hampir keseluruhan ditempati oleh kelenjar duodenal tubuler yang sangat bercabang. Kelenjar ini juga disebut kelenjar Brunner yang merupakan ciri khas dari duodenum. Kelenjar Brunner bermuara ke kripte Lieberkuhn melalui duktus sekretorius. Sekresi dari kelenjar Brunner bersifat viscous, jernih, dengan pH alkalis (pH 8,2-9,3) yang berguna untuk melindungi mukosa duodenum terhadap sifat korosif getah lambung yang asam dan mengoptimalkan pH usus bagi kerja enzim pankreas.

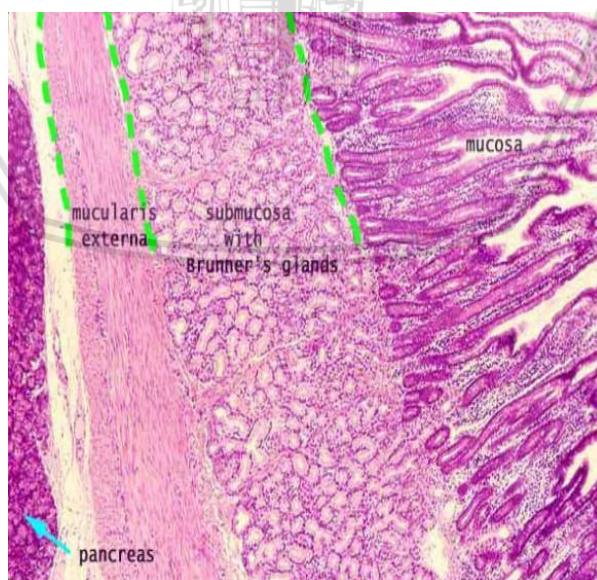
Mukosa merupakan lapisan dinding yang paling dalam. Lapisan ini terdiri dari 3 lapisan yaitu lapisan dalam adalah muskularis mukosa, lapisan tengah adalah lamina propria, dan lapisan terdalam yang terdiri dari sel-sel epitel kolumnar yang melapisi kripte dan villi-villinya.



Gambar 2.4 Villi duodenum pada tikus tinggi dan mirip daun (Treuting *et al.*, 2012)



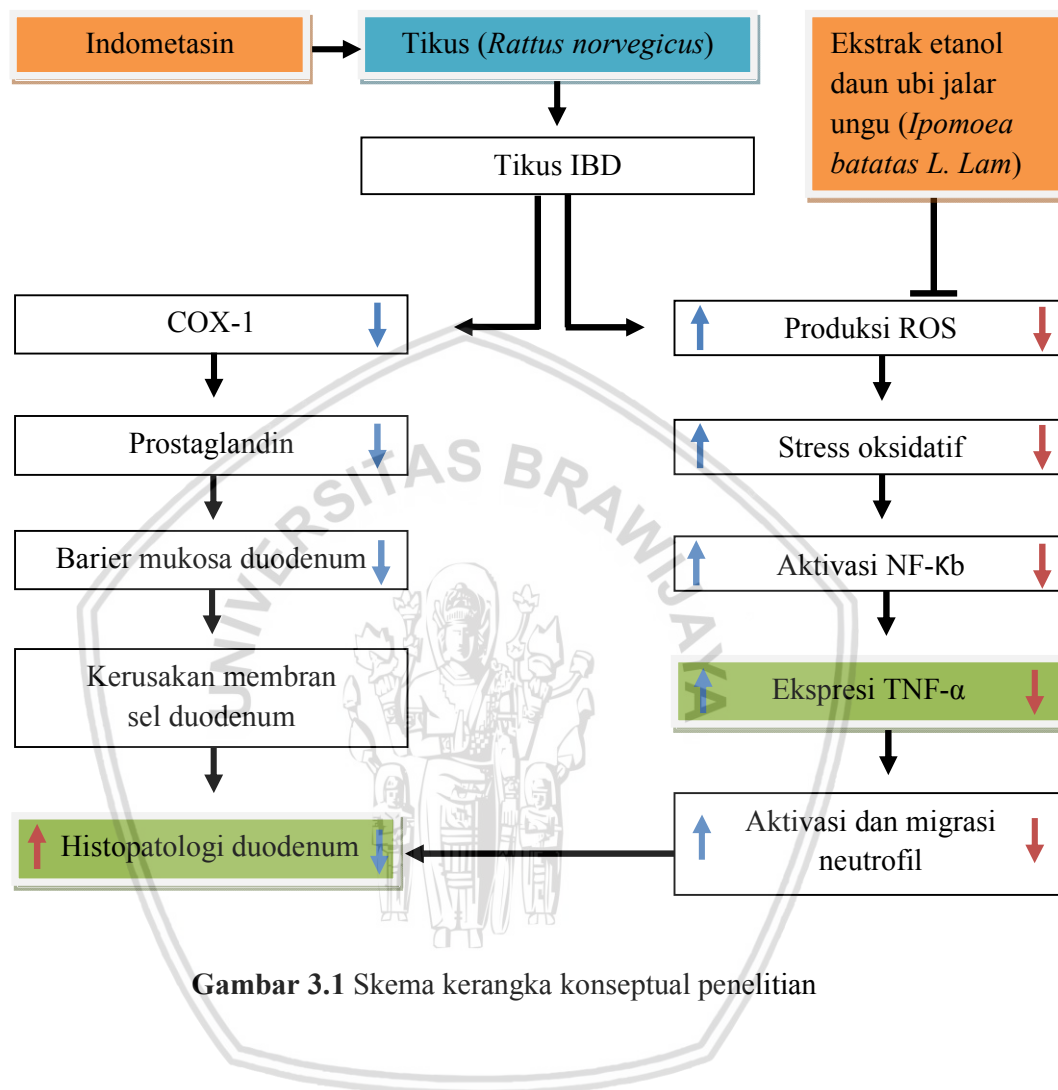
Gambar 2.5 Saluran gastrointestinal tikus (Treuting *et al.*, 2012)



Gambar 2.6 Struktur normal histologi duodenum tikus (Alley, 2008)

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan Gambar:

 : Variabel bebas

 : Variabel terikat

 : Hewan coba

↕ : Efek induksi indometasin

↕ : Pengaruh terapi

↔ : Menstimulasi

⊥ : Menghambat

Pemberian indometasin pada tikus (*Rattus norvegicus*) akan menyebabkan terhambatnya enzim siklooksigenase (COX), terutama pada siklooksigenase-1 (COX-1). Penghambatan COX-1 menyebabkan turunnya sintesis prostaglandin (PGE) yang berfungsi dalam produksi mukus sebagai barier mukosa duodenum. Perlindungan terhadap mukosa duodenum akan menurun sehingga dapat mempermudah terjadinya inflamasi dan terjadi kerusakan pada membran sel duodenum. Selain itu, indometasin yang masuk ke dalam tubuh tikus akan memacu aktivasi makrofag dan neutrofil ke dalam jaringan yang juga dapat menginduksi *reactive oxygen species* (ROS) sehingga menyebabkan terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif adalah keadaan dimana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya. Produksi ROS yang berlebihan di dalam sel dapat menyebabkan aktivasi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) dan fosforilasi inhibitor NF- κ B (I κ B). I κ B selanjutnya akan diagregasi oleh sistem proteosome. Oleh karena tidak adanya inhibitor bagi NF- κ B, maka NF- κ B akan bermigrasi ke nukleus dan mengekspresikan kemokin serta sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α). TNF- α akan mengaktivasi neutrofil yang akan bermigrasi ke jaringan duodenum yang mengalami inflamasi.

Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) yang mengandung senyawa flavonoid sebagai bahan alami antiinflamasi diyakini dapat menekan produksi ROS yang berlebih sehingga dapat mengurangi terjadinya stress oksidatif dengan menekan aktivasi NF- κ B dan I κ B. Dengan tidak teraktivasinya NF- κ B dan I κ B, maka agregasi I κ B oleh sistem proteosome tidak terjadi sehingga terjadi penurunan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α .

oleh makrofag. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi TNF- α . TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi yang mengalami penurunan ekspresi juga akan menekan terjadinya aktivasi dan migrasi neutrofil ke jaringan duodenum sehingga reaksi inflamasi yang terjadi pada jaringan duodenum akan berkurang. Dengan adanya pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang memiliki kandungan senyawa aktif berupa flavonoid, maka reaksi inflamasi dan kerusakan jaringan duodenum pada kondisi IBD dapat diperbaiki dengan cara dilakukan terapi dengan berbagai dosis.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan masalah yang dirumuskan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.
2. Pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) dapat memperbaiki kerusakan gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di beberapa laboratorium yaitu perawatan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang, pembuatan preparat histopatologi duodenum, pewarnaan HE dan pewarnaan imunohistokimia TNF- α dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya Malang, pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2018 sampai dengan bulan April 2018.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan yaitu hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berusia 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 9 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Azharis dkk., 2017):

$$t(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

$$5(n-1) \geq 15$$

t : jumlah perlakuan

$$5n-5 \geq 15$$

n : jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan penelitian berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (KP), kelompok dosis terapi 600 mg/kg BB (A), kelompok dosis terapi 700 mg/kg BB (B), dan kelompok dosis terapi 800 mg/kg BB (C) (**Tabel 4.2**). Dari lima kelompok perlakuan tersebut dilakukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Kelompok Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
KN (kontrol negatif)				
KP (kontrol positif)				
A (terapi dosis 600 mg/kg BB)				
B (terapi dosis 700 mg/kg BB)				
C (terapi dosis 800 mg/kg BB)				

Tabel 4.2 Kelompok perlakuan

Kelompok Tikus	Perlakuan
KN	Kontrol negatif, yaitu tikus tanpa perlakuan (tikus sehat)
KP	Kontrol positif, yaitu tikus yang diinduksi indometasin sebanyak satu kali dengan dosis 15 mg/kg BB, kemudian dilakukan pembedahan 24 jam setelah induksi indometasin
A	Tikus yang diinduksi indometasin sebanyak satu kali dengan dosis 15 mg/kg BB pada hari pertama, kemudian pada hari kedua diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>) dengan dosis 600 mg/kg BB sebanyak 1 ml selama 7 hari berturut-turut
B	Tikus yang diinduksi indometasin sebanyak satu kali dengan dosis 15 mg/kg BB pada hari pertama, kemudian pada hari kedua diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>) dengan dosis 700 mg/kg BB sebanyak 1 ml selama 7 hari berturut-turut
C	Tikus yang diinduksi indometasin sebanyak satu kali dengan dosis 15 mg/kg BB pada hari pertama, kemudian pada hari kedua diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (<i>Ipomoea batatas L. Lam</i>) dengan dosis 800 mg/kg BB sebanyak 1 ml selama 7 hari berturut-turut

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

- Variabel bebas : induksi indometasin dan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)
- Variabel terikat : ekspresi TNF- α dan histopatologi duodenum
- Variabel kontrol : tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar*, umur tikus 8-12 minggu, berat badan tikus berkisar antara 150-200 gram, pakan tikus, kandang tikus, dan air minum tikus *ad libitum*

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, gelas objek yang dilapisi *Poly-L-lysine*, gelas ukur 10 ml, gelas kimia (50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), erlenmeyer (250 ml, 500 ml), pengaduk kaca, tabung reaksi, mortar, mikro pipet (10 μ l, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), rak tabung reaksi, penangas air, *waterbath*, *stirrer*, botol semprot, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, seperangkat alat sentrifugasi, inkubator, oven, suntik sonde, spuit 3 ml, toples, bunsen, papan kayu, dan mikroskop cahaya.

4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun ubi jalar ungu, tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berusia 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram, indometasin, Na_2CO_3 ,

daun ubi jalar ungu, pewarna Hematoksilin Eosin, aquades, xylol, alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, dan 70%, FBS, larutan PBS pH 7,4, larutan PFA, larutan NaCl fisiologis, antibodi primer *anti rat* TNF- α , antibodi sekunder *rabbit anti rat labeled biotin*, SA-HRP, dan enzim kromagen DAB.

4.6 Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut:

1. Persiapan Hewan Coba
2. Persiapan Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* dengan Induksi Indometasin
3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)
4. Tatalaksana Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)
5. Pengambilan Sampel Organ Duodenum
6. Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum
7. Pewarnaan Preparat Histopatologi Duodenum dengan Hematoksilin Eosin (HE)
8. Pengamatan Gambaran Histopatologi Duodenum
9. Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHK)
10. Pengamatan Ekspresi TNF- α Duodenum dengan metode Imunohistokimia (IHK)

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* sebanyak 20 ekor yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Penggunaan tikus jantan pada penelitian ini dikarenakan tikus jantan tidak mengalami daur estrus yang melibatkan hormon estrogen seperti pada tikus betina. Tikus dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari empat ekor tikus sesuai ulangan. Persiapan hewan coba tikus sebelum diberi perlakuan dilakukan aklimatisasi selama 9 hari untuk adaptasi dengan lingkungan.

Tikus ditempatkan pada kandang yang terbuat dari bahan plastik dengan penutup kawat pada bagian atas kandang. Suhu ruangan kandang berkisar antara 20-26 °C dengan kelembaban udara berkisar 40-70 % (Tim Komisi Kesejahteraan Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2016). Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Kandang diletakkan di dalam ruangan yang memiliki ventilasi dan mendapat cahaya matahari secara tidak langsung.

Tikus diberi pakan dan minum secara *ad libitum*. Variasi jenis makanan yang diberikan misalnya pelet komersial, biji bunga matahari kering, jagung rebus, atau sayuran segar. Pakan tikus tidak hanya ditempatkan di tempat pakan, tetapi juga ditaburkan ke bedding lantai kandang untuk meningkatkan nafsu makan, mengekspresikan perilaku mencari makan dan menunjukkan postur normal selama makan (Tim Komisi Kesejahteraan Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2016).

4.7.2 Persiapan Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* dengan Induksi Indometasin

Hewan model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Pemberian indometasin dilakukan hanya satu kali secara per oral (Aulanni'am *et al.*, 2012). Pemberian obat secara per oral pada tikus menggunakan sonde lambung. Cairan obat yang diberikan dengan menggunakan sonde lambung dilakukan dengan cara menempelkan sonde lambung pada langit-langit mulut atas tikus, kemudian secara perlahan memasukkan sonde lambung sampai ke esofagus dan memasukkan cairan obat (Stevani, 2016).

Indometasin sebelum diberikan pada tikus harus dilarutkan dalam 5% Na₂CO₃ terlebih dahulu (Udobang *et al.*, 2017). Indometasin sebanyak 2,4 mg dilarutkan dalam 5% Na₂CO₃. Campuran indometasin dengan Na₂CO₃ kemudian dihomogenkan. Setelah dihomogenkan, larutan indometasin diberikan secara per oral pada tikus menggunakan sonde lambung yang selanjutnya akan dilakukan inkubasi selama 24 jam (Aulanni'am dkk., 2011). Berat rata-rata tikus yang digunakan \pm 160 gram. Perhitungan dosis indometasin yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut:

$$\text{Kebutuhan indometasin} : 15 \text{ mg/kg BB} \times \frac{160 \text{ gram}}{1000} = 2,4 \text{ mg/tikus}$$

Dikarenakan kapasitas maksimal lambung tikus sebanyak 3 ml, maka dibuat sediaan 2,4 mg/ml. Hal ini berarti dalam satu kali induksi, diberikan volume pemberian sebanyak 1 ml yang mengandung 2,4 mg indometasin secara per oral. Sehingga dibutuhkan 16 ml indometasin untuk 16 ekor tikus.

Pemaparan indometasin dalam kurun waktu 24 jam dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan perdarahan pada usus (Aulanni'am *et al.*, 2012). Selain itu, akan tampak adanya kerusakan pada mukosa (vili) usus halus berdasarkan pengamatan gambaran histologisnya (Sholichah dkk., 2012). Vili pada mukosa usus halus yang terpapar indometasin akan terlihat memendek, melebar dan terdapat rongga (Aulanni'am dkk., 2011). Tikus yang terkena IBD akan menunjukkan gejala klinis seperti diare.

4.7.3 Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)

Penentuan dosis ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) didasarkan pada penelitian Riansyah dkk. (2015) yang menggunakan dosis 300 mg/kg BB, 600 mg/kg BB, dan 900 mg/kg BB dengan dosis terapi antiinflamasi yang paling efektif yaitu 600 mg/kg BB. Penggunaan dosis diatas 900 mg/kg BB diduga memiliki efek toksik. Oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan dosis terapi 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB.

Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dibuat dengan mengikuti tahapan pada metode maserasi (Riansyah dkk., 2015). Maserasi terhadap daun ubi jalar ungu dapat dilakukan melalui langkah-langkah berikut: Daun ubi jalar ungu yang telah dibersihkan lalu dipotong kecil-kecil kemudian dikering-anginkan. Selanjutnya dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96 % selama 3 x 24 jam kemudian disaring. Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dipekatkan dengan *rotary evaporator* (Sulastri dkk., 2017).

4.7.4 Tatalaksana Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*)

Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) diberikan dengan dosis 600 mg/kg BB yang diberikan sebagai terapi untuk kelompok perlakuan A, dosis 700 mg/kg BB yang diberikan sebagai terapi untuk kelompok perlakuan B, dan dosis 800 mg/kg BB yang diberikan sebagai terapi untuk kelompok perlakuan C. Metode pemberian terapi dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung. Terapi diberikan satu kali sehari selama 7 hari berturut-turut dengan volume pemberian sebanyak 1 ml.

4.7.5 Pengambilan Sampel Organ Duodenum

Pengambilan organ duodenum pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-11. Pengambilan organ duodenum dilakukan dengan melakukan pembedahan pada tikus terlebih dahulu. Sebelum dibedah, tikus dieuthanasi dengan cara mendislokasi hewan coba di daerah leher, kemudian diletakkan pada papan bedah dan diposisikan rebah dorsal. Selanjutnya dilakukan pembedahan pada bagian abdomen. Setelah hewan dibedah, dilakukan pengambilan organ duodenum dengan cara diisolasi dan dipotong dari organ usus halus yang lain. Bagian duodenum yang diambil kemudian diletakkan pada cawan petri kemudian dicuci dengan larutan NaCl fisiologis. Selanjutnya organ duodenum direndam ke dalam larutan PFA (*Paraformaldehyde*) 4% untuk difiksasi (Scudamore, 2014).

4.7.6 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

4.7.6.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan melakukan perendaman organ duodenum ke dalam larutan PFA (*Paraformaldehyde*) 4%. Fiksasi bertujuan untuk menghentikan metabolisme sel, mencegah degradasi enzimatis sel dan jaringan dengan autolisis, membunuh mikroorganisme patogen seperti bakteri, jamur, dan virus, serta mengeraskan jaringan. Larutan fiksatif *formaldehyde* akan mempertahankan struktur umum sel dan komponen ekstraselular (Pawlina, 2016). Organ duodenum diambil dengan tebal irisan jaringan 3-5 mm dan segera dilakukan fiksasi dalam kurun waktu minimal 24 jam dengan menggunakan *formaldehyde* sebagai bahan pengawet. Volume cairan fiksasi sekurang-kurangnya 15-20x volume jaringan yang akan difiksasi (Jusuf, 2009).

4.7.6.2 Dehidrasi

Spesimen dicuci setelah difiksasi dan dilakukan dehidrasi dalam serangkaian larutan alkohol bertingkat sampai konsentrasi 100% untuk menghilangkan air (Pawlina, 2016). Dehidrasi biasanya dilakukan dengan perendaman dalam larutan alkohol, seperti etanol, dari konsentrasi 70% sampai 100% (Treuting and Dintzis, 2012). Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga jaringan nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Dehidrasi dilakukan dengan melakukan perendaman jaringan duodenum dalam alkohol bertingkat dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol

absolut (I dan II) (Jusuf, 2009). Proses ini dilakukan pada masing-masing cairan selama dua jam.

4.7.6.3 Penjernihan (*Clearing*)

Clearing adalah suatu tahap untuk mengeluarkan alkohol dari jaringan duodenum dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin. Jaringan tidak dapat langsung dimasukkan ke dalam parafin karena alkohol dan parafin tidak bisa saling melarutkan. Setelah jaringan duodenum dikeluarkan dari cairan dehidrasi (alkohol), jaringan dimasukkan ke dalam *xylol* I selama 1 jam. Kemudian untuk menyakinkan bahwa seluruh cairan alkohol telah keluar, jaringan dipindahkan ke cairan *xylol* II. Lama inkubasi dalam *xylol* tergantung pada besarnya jaringan, tetapi biasanya berkisar antara ½-1 jam (Jusuf, 2009). Setelah cairan dehidrasi (alkohol) telah benar-benar dikeluarkan, agen *clearing* (*xylol*) akan membuat jaringan duodenum menjadi tembus cahaya (Treuting and Dintzis, 2012).

4.7.6.4 Infiltrasi Parafin

Jaringan duodenum kemudian direndam dalam parafin cair di dalam oven dengan suhu 56-59 °C. Proses infiltrasi parafin berlangsung selama kira-kira ½ jam. Setelah itu jaringan siap untuk dimasukkan kedalam blok parafin (Jusuf, 2009).

4.7.6.5 Penanaman Jaringan (*Embedding*)

Embedding adalah proses untuk mengeluarkan agen *clearing* (*xylol*) dari jaringan duodenum dan diganti dengan parafin. Pada tahap ini jaringan duodenum harus benar-benar bebas dari *xylol* karena sisa *xylol* dapat mengkristal dan sewaktu dipotong dengan mikrotom akan menyebabkan jaringan duodenum

menjadi mudah robek. *Embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan duodenum ke dalam cetakan yang didalamnya berisi parafin cair. Jaringan duodenum dibenamkan ke dalam parafin I selama 2 jam, jaringan kemudian dipindahkan ke dalam parafin II selama 1 jam, dan selanjutnya jaringan duodenum dimasukkan ke dalam parafin III selama 2 jam. Setelah penanaman jaringan duodenum, proses dilanjutkan dengan pengecoran/*blocking* (Jusuf, 2009).

4.7.6.6 Penanaman di Parafin (*Blocking*)

Blocking adalah proses pembuatan blok preparat agar dapat dipotong dengan mikrotom. Dalam proses *blocking* menggunakan cetakan dari plastik dan piringan logam. Cetakan diletakkan di atas piringan logam. Sedikit cairan parafin dituangkan ke dalam cetakan tersebut. Kemudian jaringan duodenum secepatnya dimasukkan ke dalam cetakan dengan menggunakan pinset yang telah dipanaskan dan diatur posisinya di dalam cetakan. Parafin cair kemudian dituangkan kembali hingga menutupi seluruh cetakan tersebut. Selama tindakan ini, cetakan dan piringan logam harus diletakkan diatas hot plate (Jusuf, 2009).

4.7.6.7 Pemotongan (*Mounting*)

Mounting adalah proses pemotongan blok preparat dengan menggunakan mikrotom. Teknik pemotongan parafin yang mengandung preparat adalah sebagai berikut (Jusuf, 2009):

- 1) Blok parafin yang mengandung preparat direkatkan pada tempat duduknya di mikrotom. Tempat duduk blok parafin beserta blok parafinnya kemudian diletakkan pada pemegangnya (holder) pada mikrotom dan dikunci dengan kuat.

- 2) Pisau mikrotom diletakkan pada tempatnya dan diatur sudut kemiringannya (berkisar 20-30 derajat).
- 3) Diatur ketebalan potongan (ketebalan 5-7 μm).
- 4) Digerakkan blok preparat ke arah pisau sedekat mungkin kemudian blok preparat dipotong secara teratur dan ritmis. Dibuang pita-pita parafin yang awal tanpa jaringan duodenum hingga didapatkan potongan yang mengandung preparat jaringan duodenum.
- 5) Pita parafin yang mengandung jaringan duodenum dipindahkan secara hati-hati menggunakan kuas ke dalam *waterbath* dengan suhu 37-40 °C dan dibiarkan beberapa saat hingga pita parafin tersebut mengembang.
- 6) Setelah pita parafin terkembang dengan baik, pita parafin ditempelkan pada objek glass yang telah *dicoated* (disalut) dengan zat perekat seperti albumin (putih telur) dengan cara memasukkan objek glass tersebut ke dalam *waterbath* dan menggerakkannya ke arah pita parafin. Selanjutnya pita parafin ditempelkan pada objek glass dengan menggunakan kuas. Setelah melekat, objek glass digerakkan keluar dari *waterbath* dengan hati-hati agar pita parafin tidak melipat.
- 7) Objek glass yang berisi pita parafin diletakkan di atas hot plate dengan temperatur 40-45 °C dan dibiarkan selama beberapa jam. Cara lainnya adalah dengan melewati objek glass di atas api sehingga pita parafin melekat erat di atas objek glass.
- 8) Setelah kering dan pita parafin telah melekat dengan kuat, objek glass berisi potongan parafin dan jaringan disimpan sampai saatnya untuk diwarnai.

4.7.7 Pewarnaan Preparat Histopatologi Duodenum dengan Hematoksin Eosin (HE)

Pewarnaan HE menggunakan zat pewarna hematoksin dan eosin. Hematoksin akan mewarnai bagian nukleus dan memberikan warna biru (basofilik) sedangkan eosin akan mewarnai sitosol dan matriks ekstraselular yang akan memberikan warna merah muda (Low *et al.*, 2016). Pewarnaan HE diawali dengan deparafinisasi. Pada tahapan ini preparat dimasukkan ke dalam *xylol* I, II, dan III masing-masing 3 menit, setelah itu tepi jaringan dibersihkan dengan kain kasa. Tahapan selanjutnya yaitu rehidrasi. Pada tahapan ini preparat dimasukkan ke dalam alkohol 100%, 95%, 80%, dan 70% masing-masing 3 menit. Setelah itu preparat dialiri dengan air mengalir selama 3 menit dan dilanjutkan dengan pengecatan inti sel. Preparat dimasukkan ke dalam *Mayer Hematoxylin* selama 15 menit kemudian dialiri dengan air mengalir selama \pm 3 menit. Selanjutnya preparat direndam dalam alkohol 70% I selama 3 menit, alkohol 70% II selama 3 menit, dan alkohol 70% III selama 3 menit. Setelah itu preparat dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 5 menit. Tahapan berikutnya yaitu dehidrasi. Tahapan ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol 70%, 80%, 95%, dan 100% masing-masing 3 menit dan dilanjutkan dengan *clearing* menggunakan *xylol* I dan II masing-masing 3 menit. Tahapan berikutnya adalah *mounting* yang dilakukan dengan cara meneteskan preparat menggunakan *entellan* dan menutup dengan objek glass (Ariyadi dan Suryono, 2017).

4.7.8 Pengamatan Gambaran Histopatologi Duodenum

Preparat duodenum yang sudah siap diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi duodenum meliputi perubahan

histopatologi secara mikroskopis akibat induksi indometasin yakni terjadi kerusakan vili dan infiltrasi sel radang di lamina propria (Harusato *et al.*, 2009).

4.7.9 Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHK)

Prosedur pengujian ekspresi TNF- α menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Khusus untuk slide yang dicat dengan imunohistokimia menggunakan objek glass yang sudah dilapisi daya rekat seperti *Poly-L-lysine*. Langkah pertama adalah slide preparat dicuci dalam PBS pH 7,4, selanjutnya ditetesi hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% selama 20 menit. Kemudian preparat dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit). Preparat diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) selama 1 jam kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Preparat kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat* TNF- α selama semalam pada suhu 4 °C kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Selanjutnya dilakukan inkubasi pada preparat dengan antibodi sekunder *rabbit anti rat labeled biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Lalu preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep avidin-Horse Radin Peroxidase*) untuk diinkubasi selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Preparat kemudian ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan diinkubasi selama 10 menit. Selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). *Counterstaining* dilakukan menggunakan *Mayer Hematoxylin* selama 10 menit, kemudian dicuci dan dikeringkan. Preparat di *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass* (Suryani dkk., 2013).

4.7.10 Pengamatan Ekspresi TNF- α Duodenum dengan metode Imunohistokimia (IHK)

Ekspresi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) dalam jaringan akan muncul dengan warna coklat dan terdapat di sekitar tunika mukosa yang menunjukkan adanya reaksi inflamasi. Keberadaan ekspresi TNF- α dalam duodenum yang diamati melalui metode imunohistokimia (IHK) dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan distribusi TNF- α dalam sediaan histologi masing-masing kelompok penelitian dengan perlakuan pada perbesaran 400x dan dipotret serta dilakukan analisa menggunakan *immunoratio software*.

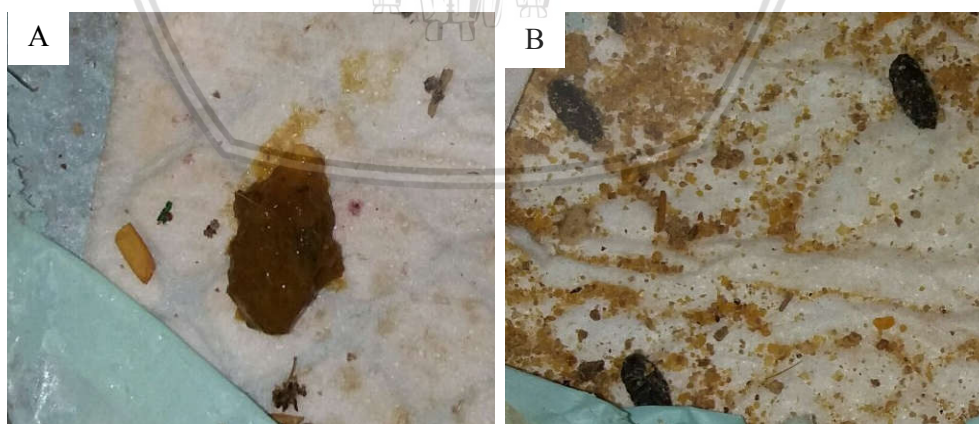
4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari perhitungan ekspresi TNF- α organ duodenum yang telah dikonversikan ke dalam persentase dan diproses menggunakan *immunoratio software*, kemudian dianalisis secara kuantitatif statistik dengan suatu perangkat lunak *SPSS 16.0 Edition for Windows* dengan melakukan uji *one-way* ANOVA dan dilanjutkan dengan analisis lanjutan menggunakan uji *Tukey* ($\alpha = 5\%$). Data dari perubahan gambaran histopatologi organ duodenum dianalisis secara kualitatif deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kondisi Tikus (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Indometasin

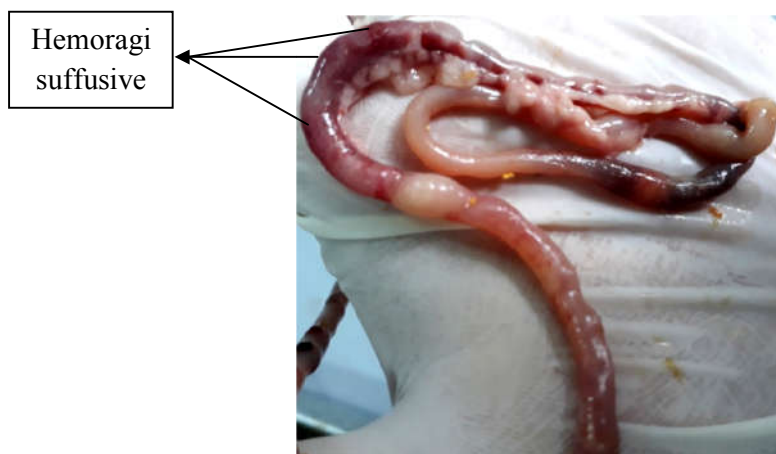
Pembuatan tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dilakukan dengan melakukan pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Indometasin diberikan satu kali secara peroral dengan menggunakan sonde lambung kemudian diinkubasi selama 24 jam. Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian, kondisi tikus 24 jam pasca induksi indometasin menimbulkan gejala klinis berupa diare. Selain diare juga terjadi penurunan berat badan pada tikus (**Lampiran 5**). Feses yang dikeluarkan oleh tikus yang mengalami diare memiliki konsistensi cair. Feses tikus kelompok perlakuan KP (kontrol positif) memiliki konsistensi cair sedangkan feses tikus kelompok perlakuan KN (kontrol negatif) memiliki konsistensi padat (**Gambar 5.1**). Diare tersebut terjadi dikarenakan adanya gangguan absorpsi di dalam duodenum.



Gambar 5.1 Konsistensi feses tikus kelompok KP cair (A) dan feses tikus kelompok KN padat (B)

Gangguan absorpsi yang terjadi di dalam duodenum terjadi akibat efek dari pemberian indometasin. Indometasin menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi lebih efektif menghambat COX-1. COX-1 berperan dalam pembentukan prostaglandin pada duodenum. Prostaglandin sendiri memiliki fungsi sebagai penghasil mukus yang berfungsi sebagai barrier mukosa duodenum (Takeuchi *et al.*, 2003). Apabila COX-1 dihambat maka akan terjadi penurunan prostaglandin pada duodenum yang menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa duodenum sehingga memicu terjadinya inflamasi dan rusaknya mukosa pada duodenum. Hal ini menyebabkan terjadinya gangguan absorpsi pada duodenum. Penurunan berat badan yang terjadi pada tikus diakibatkan karena terjadinya penurunan nafsu makan akibat rasa nyeri yang dirasakan tikus pada bagian abdomen. Untuk mengetahui rasa nyeri pada abdomen tikus dilakukan dengan melakukan palpasi pada bagian abdomen tikus.

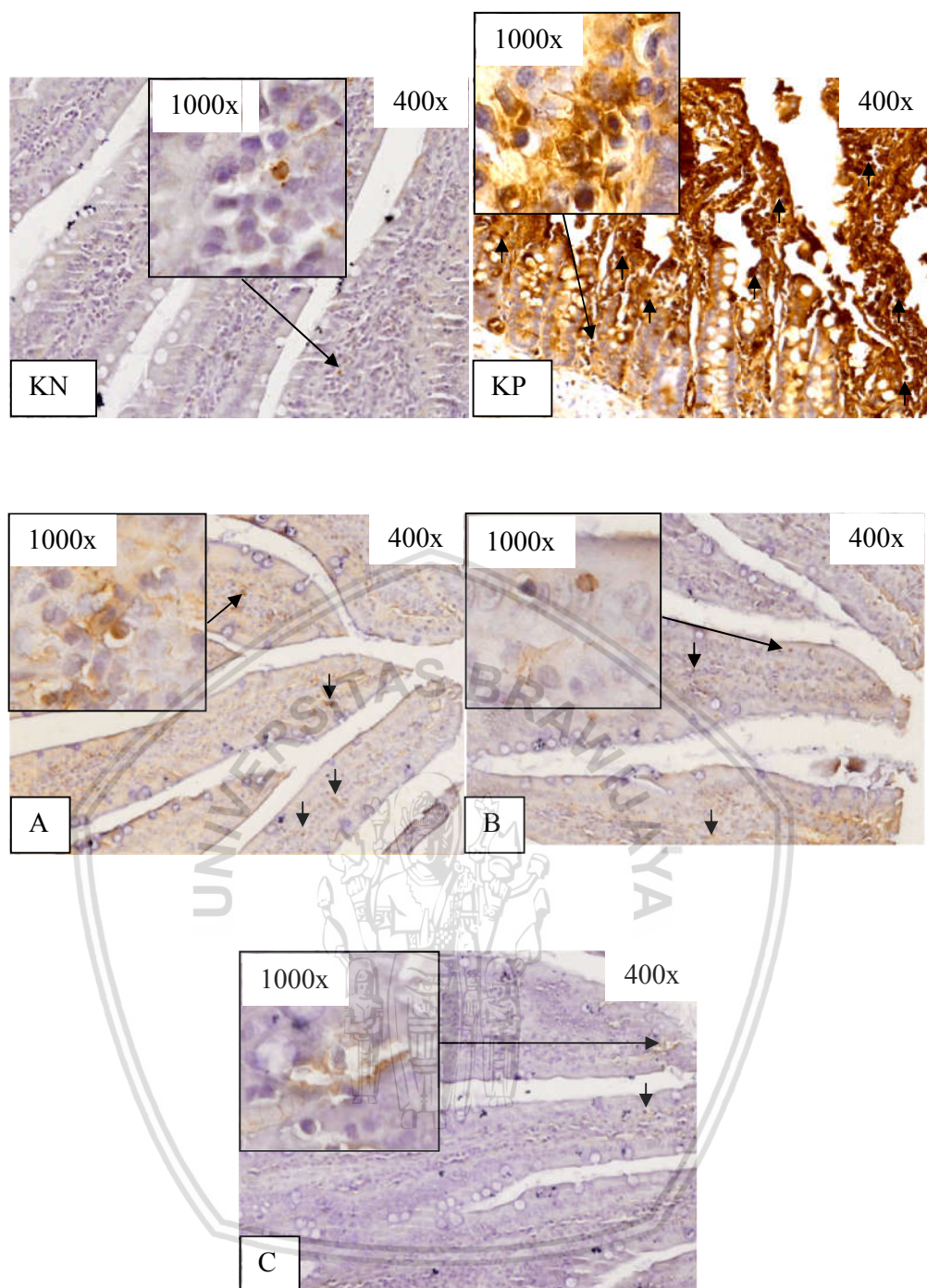
Pasca 24 jam induksi indometasin, dilakukan pembedahan pada tikus kelompok perlakuan KP (kontrol positif). Secara makroskopis, organ duodenum tikus kelompok perlakuan B tampak kemerahan dan menunjukkan adanya lesi hemoragi (**Gambar 5.2**). Kemerahan yang tampak pada organ duodenum menunjukkan terjadinya inflamasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Aulanni'am *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa asupan oral indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan perdarahan (hemoragi) pada usus. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pada organ duodenum tampak adanya perdarahan yang meluas dengan ukuran > 3 cm. Bentuk perdarahan ini dinamakan hemoragi suffusive.



Gambar 5.2 Hemoragi suffusive pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*)

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap Ekspresi TNF- α pada Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* Hasil Induksi Indometasin

Tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin akan mengekspresikan sitokin proinflamasi TNF- α . Ekspresi TNF- α pada preparat dapat diketahui dari warna coklat yang tampak pada gambaran imunohistokimia (**Gambar 5.3**). Munculnya warna coklat sebagai marker TNF- α dikarenakan adanya ikatan kompleks antigen-antibodi yang dikenali oleh SA-HRP (*Streptavidin-Horse Radin Peroxidase*) yang akan mengikat substrat spesifik yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2) yang kemudian akan teroksidasi menjadi O_2 dan H_2O . Selanjutnya O_2 akan berikatan dengan substrat kromagen DAB (*Diamino Benzidine*) yang menimbulkan warna coklat (Wulandari, 2013). Warna coklat pada jaringan atau sel di duodenum yang menandakan terdapatnya sitokin TNF- α , ditunjukkan dengan anak panah (\uparrow) dan data ditabulasi pada **Tabel 5.1**.



Gambar 5.3 Gambaran imunohistokimia TNF- α salah satu dari lima lapang pandang pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin dengan perbesaran 400x dan 1000x. Ket (\uparrow) menunjukkan ekspresi TNF- α . Kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), terapi dosis 600 mg/kg BB (A), terapi dosis 700 mg/kg BB (B), terapi dosis 800 mg/kg BB (C).

Pada **Tabel 5.1**, kelompok perlakuan KN (kontrol negatif), kelompok perlakuan KP (kontrol positif), kelompok perlakuan A (terapi dosis 600 mg/kg BB), kelompok perlakuan B (terapi dosis 700 mg/kg BB), dan kelompok perlakuan C (terapi dosis 800 mg/kg BB) ditemukan adanya ekspresi TNF- α dengan intensitas yang berbeda-beda. Pada kelompok KN ditemukan TNF- α dengan persentase luas area yang paling rendah. Pada kelompok KP, A, B, dan C, persentase luas area TNF- α lebih besar daripada kelompok KN. Kelompok KP memiliki persentase luas area TNF- α paling besar jika dibandingkan dengan kelompok lain.

Tabel 5.1 Rata-rata ekspresi TNF- α duodenum tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi TNF- α	Peningkatan (%)	Penurunan (%)
KN (kontrol negatif)	0.09 ± 0.02^a	-	-
KP (kontrol positif)	0.82 ± 0.02^e	88.91	-
A (terapi dosis 600 mg/kg BB)	0.56 ± 0.05^d	-	31.93
B (terapi dosis 700 mg/kg BB)	0.34 ± 0.03^c	-	58.25
C (terapi dosis 800 mg/kg BB)	0.18 ± 0.01^b	-	77.55

Ket : perbedaan notasi (a, b, c, d, dan e) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok perlakuan terhadap ekspresi TNF- α .

Hasil analisis statistik ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) signifikan ($p < 0.05$) menurunkan ekspresi TNF- α dan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok

terapi A, B, dan C. Hasil uji lanjutan yaitu uji *Tukey* menunjukkan adanya perlakuan yang terbaik pada pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) (**Tabel 5.1, Lampiran 7**).

Pada kelompok perlakuan KN (kontrol negatif) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α terendah, yaitu sebesar 0.09 ± 0.02 (Tabel 5.1). Kelompok perlakuan KN tetap menunjukkan ekspresi TNF- α karena pada kondisi normal, TNF- α diproduksi oleh tubuh sebagai produk hasil metabolisme tubuh yang normal untuk mempertahankan kondisi homeostasis dalam sistem imunitas. TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag dan hampir terdapat pada semua jaringan (Vielhauer and Mayadas, 2007).

Pada kelompok perlakuan KP (kontrol positif) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 0.82 ± 0.02 dengan persentase peningkatan TNF- α sebesar 88.91 %. Adanya peningkatan TNF- α mengindikasikan terjadinya inflamasi pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) akibat induksi indometasin. Indometasin akan menghambat COX-1 dan COX-2, tetapi dianggap lebih efektif menghambat COX-1 yang berperan dalam pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barrier usus sehingga dapat memicu terjadinya inflamasi (Takeuchi *et al.*, 2003). Hal ini menandakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamasi TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi (Tjahjani dkk., 2016). Disamping itu, indometasin juga dapat memicu pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS yang berlebih akan menstimulasi pengaktifan *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) yang merupakan

faktor transkripsi dalam mengatur ekspresi sel-sel sitokin pro inflamasi seperti TNF- α (Aulanni'am dkk., 2011).

Pada kelompok perlakuan terapi terjadi penurunan ekspresi TNF- α . Pada kelompok perlakuan A (terapi dosis 600 mg/kg BB) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 0.56 ± 0.05 dengan persentase penurunan TNF- α sebesar 31.93 %. Pada kelompok perlakuan B (terapi dosis 700 mg/kg BB) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 0.34 ± 0.03 dengan persentase penurunan TNF- α sebesar 58.25 %. Pada kelompok perlakuan C (terapi dosis 800 mg/kg BB) menunjukkan hasil rata-rata ekspresi TNF- α sebesar 0.18 ± 0.01 dengan persentase penurunan TNF- α tertinggi, yaitu sebesar 77.55 %. Penurunan ekspresi TNF- α terjadi disebabkan karena adanya kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. Lam).

Berdasarkan data hasil perhitungan persentase penurunan ekspresi TNF- α , dosis terapi ekstrak daun ubi jalar ungu sebanyak 800 mg/kg BB lebih efektif digunakan sebagai terapi IBD karena dapat menurunkan ekspresi TNF- α dengan persentase penurunan TNF- α tertinggi, yaitu sebesar 77.55 %. Penurunan ekspresi TNF- α ini menunjukkan adanya perbaikan inflamasi oleh flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang bertindak antiinflamasi dan antioksidan.

Mekanisme aktivitas antioksidan dari flavonoid dengan jalan menangkap radikal bebas (Johnson and Pace, 2010). Radikal bebas yang ditangkap oleh flavonoid dapat menurunkan produksi ROS. Hal ini dapat mengurangi terjadinya stress oksidatif dengan menekan aktivasi NF- κ B dan I κ B. Dengan tidak teraktivasinya NF- κ B dan I κ B, maka agregasi I κ B oleh sistem proteosome tidak

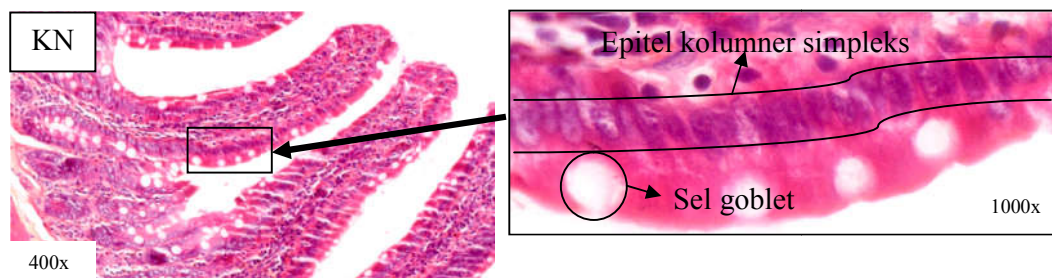
terjadi sehingga terjadi penurunan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α oleh makrofag. Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi TNF- α . TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi yang mengalami penurunan ekspresi juga akan menekan terjadinya aktivasi dan migrasi neutrofil ke jaringan duodenum sehingga reaksi inflamasi yang terjadi pada jaringan duodenum akan berkurang.

Berdasarkan hasil penelitian, semua kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan notasi (a, b, c, d, dan e). Hal ini berarti terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok perlakuan terhadap ekspresi TNF- α , sedangkan apabila muncul notasi yang sama berarti tidak ada perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan C (terapi dosis 800 mg/kg BB) yang dapat menurunkan ekspresi TNF- α dengan persentase penurunan TNF- α tertinggi sebesar 77.55 %, memiliki notasi yang berbeda atau tidak sama dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti pada dosis 800 mg/kg BB mampu menekan terjadinya inflamasi pada duodenum namun dosis ini bukan merupakan dosis paling optimal sebagai antiinflamasi untuk kasus IBD sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut. Hal ini didukung oleh hasil penelitian pada Tabel 5.1 yang menunjukkan bahwa rata – rata ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan C tidak sama dan hanya mendekati hasil rata – rata ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif.

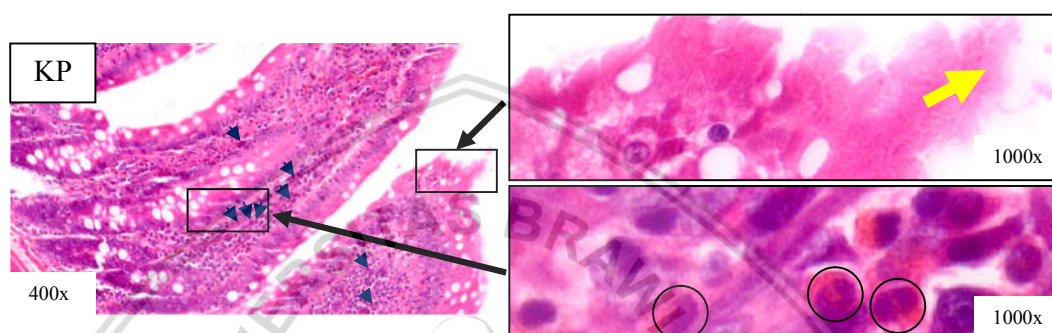
5.3 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. Lam) terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* Hasil Induksi Indometasin



Tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) hasil induksi indometasin akan mengalami kerusakan pada membran sel duodenum karena terhambatnya jalur COX-1 yang menyebabkan turunnya sintesis prostaglandin (PGE) yang berfungsi dalam produksi mukus sebagai barier mukosa duodenum. Kerusakan yang terjadi pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin dapat diketahui melalui pengamatan preparat histopatologi.

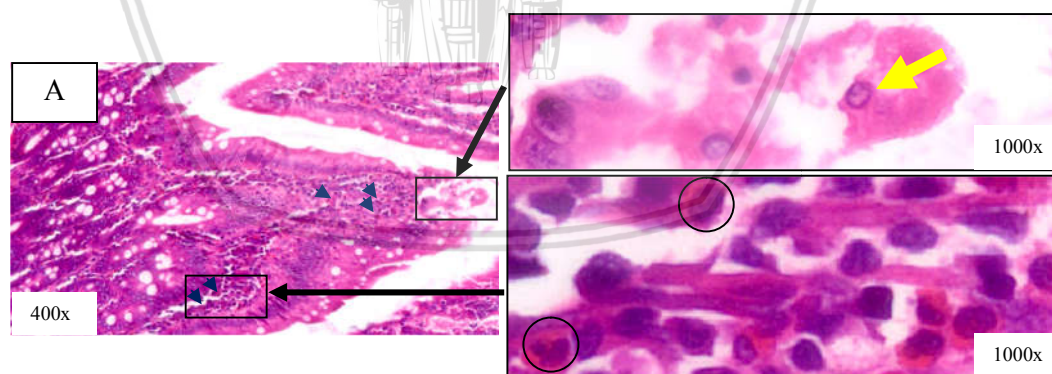
Perbaikan kerusakan gambaran histopatologi akibat induksi indometasin ditunjukkan pada gambaran histopatologi pewarnaan HE. Gambaran histologi kelompok perlakuan KN (**Gambar 5.4**) sangat berbeda dengan kelompok perlakuan KP (**Gambar 5.5**). Pada kelompok tikus IBD (KP) tampak adanya kerusakan pada vili duodenum berupa nekrosis liquefaktif dan infiltrasi sel radang pada lamina propria. Vili duodenum berbentuk pendek dan lebar. Hal ini sesuai dengan penelitian Aulanni'am dkk. (2011) yang menyatakan bahwa vili pada mukosa usus halus yang terpapar indometasin akan terlihat memendek dan melebar. Menurut Treuting *et al.* (2012), bentuk vili duodenum pada tikus normalnya yaitu tinggi dan berbentuk mirip seperti daun. Hal ini menunjukkan bahwa induksi indometasin yang diberikan selama sehari dengan dosis 15 mg/kg BB dapat merusak struktur histologis duodenum tikus.





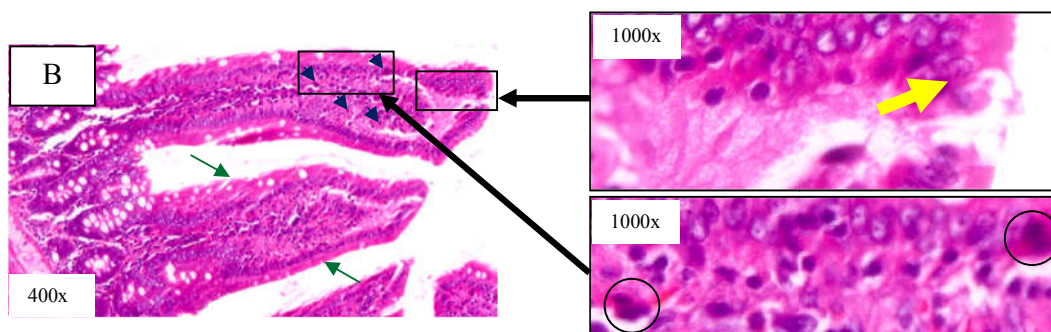
Gambar 5.4 Histologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol negatif dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x



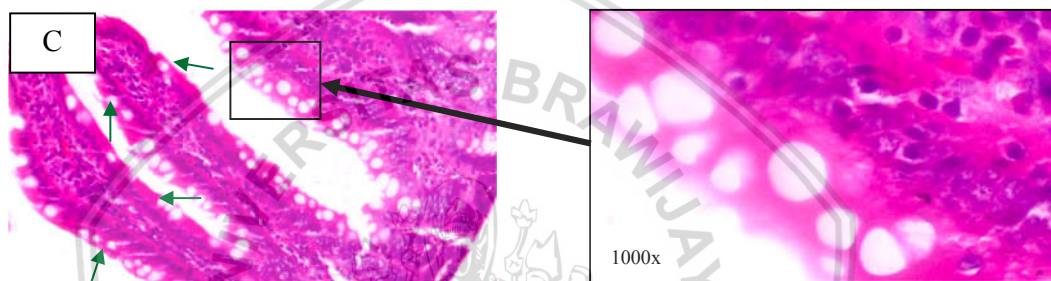
Gambar 5.5 Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol positif dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x. Ket () menunjukkan adanya kerusakan pada vili duodenum, ket () menunjukkan infiltrasi sel radang pada lamina propria



Gambar 5.6 Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi dosis 600 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x. Ket () menunjukkan adanya kerusakan pada vili duodenum, ket () menunjukkan infiltrasi sel radang pada lamina propria



Gambar 5.7 Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi dosis 700 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x. Ket (↗) menunjukkan adanya kerusakan pada vili duodenum, ket (↖) menunjukkan infiltrasi sel radang pada lamina propria, ket (↗) menunjukkan perbaikan bentuk vili duodenum



Gambar 5.8 Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi dosis 700 mg/kg BB dengan pewarnaan HE perbesaran 400x dan 1000x. Ket (↗) menunjukkan perbaikan bentuk vili

Pemberian indometasin akan menyebabkan terhambatnya enzim siklooksigenase (COX), terutama COX-1. Penghambatan COX-1 menyebabkan turunnya sintesis prostaglandin (PGE) yang berfungsi dalam produksi mukus sebagai barier mukosa duodenum (Takeuchi *et al.*, 2003). Apabila perlindungan terhadap mukosa duodenum menurun, dapat mempermudah terjadinya inflamasi dan terjadi kerusakan pada membran sel duodenum. Selain itu, indometasin yang masuk ke dalam tubuh tikus akan memacu aktivasi sel-sel radang (makrofag dan neutrofil) ke dalam jaringan yang dapat menginduksi *reactive oxygen species*

(ROS). Produksi ROS berlebih dapat menyebabkan peningkatan aktivasi *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) yang merupakan faktor transkripsi dalam mengatur ekspresi sel-sel sitokin pro inflamasi seperti TNF- α . TNF- α akan mengaktifasi neutrofil yang akan bermigrasi ke jaringan duodenum yang mengalami inflamasi (Tjahjani dkk., 2016).

Pada gambaran histopatologi kelompok A (terapi dosis 600 mg/kg BB) menunjukkan adanya kerusakan pada vili duodenum berupa erosi epitel pada duodenum dan terdapat infiltrasi sel radang pada lamina propria (**Gambar 5.6**). Pada gambaran histopatologi kelompok B (terapi dosis 700 mg/kg BB) menunjukkan adanya perbaikan bentuk vili duodenum dengan masih ada sedikit erosi epitel pada bagian ujung vili namun infiltrasi sel radang berkurang (**Gambar 5.7**). Selain itu, juga tampak adanya hiperplasia pada sel-sel epitel duodenum. Pada gambaran histopatologi kelompok C (terapi dosis 800 mg/kg BB), perbaikan vili dan susunan sel-sel epitel kolumnar mulai terlihat (**Gambar 5.8**). Sel goblet juga tampak mengalami hiperplasia, hal ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel goblet untuk memicu terjadinya sintesis dan sekresi mukus. Produksi mukus dapat meningkatkan proteksi permukaan mukosa duodenum. Bentuk vili duodenum juga mulai mengalami perbaikan. Susunan vili tampak panjang, berbentuk mirip seperti daun dan tampak kembali seperti susunan normal.

Flavonoid dalam daun ubi jalar ungu berperan dalam perbaikan struktur histopatologi duodenum tikus yang diinduksi indometasin. Perbaikan struktur histologi yang dimaksud yaitu perbaikan struktur vili dan perbaikan struktur sel epitel kolumnar. Flavonoid ini berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan.

Flavonoid akan menghambat aktivasi sel-sel inflamasi sehingga tidak terjadi respon inflamasi. Radikal bebas yang ditangkap oleh flavonoid selanjutnya akan diubah menjadi senyawa yang stabil. Semakin banyak radikal bebas yang diubah menjadi senyawa stabil maka semakin cepat pula proses perbaikan kerusakan sel epitel kolumnar melalui proses regenerasi sel (Champbell *et al.*, 2006). Hasil terbaik ditunjukkan oleh pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dosis 800 mg/kg BB.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) berpengaruh terhadap perubahan ekspresi TNF- α pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat menurunkan ekspresi TNF- α sebesar 77.55 % dihasilkan dari pemberian terapi dosis 800 mg/kg BB sebagai dosis terbaik.
2. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Lam*) berpengaruh terhadap gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat memperbaiki gambaran histopatologi duodenum tikus dalam hal perbaikan kerusakan vili dan berkurangnya infiltrasi sel radang pada lamina propria dengan dosis terbaik sebesar 800 mg/kg BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk terapi IBD menggunakan daun ubi jalar ungu dengan dosis diatas 800 mg/kg BB untuk mengetahui dosis yang paling optimum untuk pengobatan IBD dan dapat mengetahui takaran dosis yang dapat menimbulkan toksisitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabla Press. Jakarta.
- Allenspach, K., B. Wieland, A. Grone, and F. Gaschen. 2007. Chronic Enteropathies in Dogs: Evaluation of Risk Factors for Negative Outcome. *J Vet Intern Med*, 21: 700 - 708.
- Alley, J. R. 2008. *Stomach and Duodenum Student Lecture Series*. University of Kansas. USA.
- Ariyadi, T. dan H. Suryono. 2017. Kualitas Sediaan Jaringan Kulit Metode Microwave dan Conventional Histoprocessing Pewarnaan Hematoxylin Eosin. *Jurnal Labora Medika*, 1(1): 7-11.
- Aulanni'am, A. Rosdiana, and N. L. Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences*, 6(2): 144-154.
- Aulanni'am, A. Rosdiana, dan N. L. Rahmah. 2011. Potensi Fraksi Etanol dan Etil Asetat Rumpun Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) Terhadap Penurunan Kadar Malondialdehid dan Perbaikan Gambaran Histologis Jejunum Usus Halus Tikus IBD (Inflammatory Bowel Disease). *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan*, (4)1: 57-64.
- Azharis, M., D. Oktaviana, dan Mashur. 2017. Pengaruh Pemberian Getah Ashitaba (*Angelica keiskei*) Terhadap Bobot Potong, Bobot Karkas Dan Kualitas Fisik Daging Ayam Broiler. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 1(1): 21-28.
- Baratawidjaja, K. G. dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar Edisi ke-11 (Cetakan ke-2)*. Badan Penerbit FKUI. Jakarta.
- Boyer, D., Bauman, J. N., Walker, D. P., Kapinos, B., Karki, K., dan Kalgutkar, A. S. 2009. Utility of Meta Site in Improving Metabolic Stability of the Neutral Indomethacin Amide Derivative and Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor 2-(1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-N-phenethyl acetamide. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(5): 999-1008.
- Burstein, E. and E. R. Fearon. 2008. Colitis and Cancer: A Tale of Inflammatory Cells and Their Cytokines. *JCI*, 118(2): 464-7.
- Campbell, K. J. and N. D. Perkins. 2006. Regulation of NF-kappaB Function. *Biochem Soc Symp*, 73:165-180.

- Defarges, A. 2018. *Inflammatory Bowel Disease in Small Animals*. www.merckvetmanual.com. [15 Januari, 2018].
- Depkes. 2006. *Pharmaceutical Care Untuk Pasien Penyakit Arthritis Rematik*. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Departemen Kesehatan. Jakarta.
- Fajriani. 2008. Penggunaan obat anti-inflamasi nonsteroid pada anak. *Dentofasial*, 7(1): 1-6.
- Firmansyah, M. A. 2013. Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Inflammatory Bowel Disease. *CDK-203*, 40(4): 247-252.
- German, A. J., E. J. Hall, and M. J. Day. 2003. Chronic Intestinal Inflammation and Intestinal Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, 17:8–20.
- Hambali, M., F. Mayasari, dan F. Noermansyah. 2014. Ekstraksi Antosianin dari Ubi Jalar dengan Variasi Konsentrasi Solven, dan Lama Waktu Ekstraksi. *Teknik Kimia*, 20(2): 25-35.
- Harusato, A., Y. Naito, T. Takagi, S. Yamada, K. Mizushima, Y. Hirai, R. Horie, K. Inoue, K. Fukumoto, I. Hirata, T. Omatsu, E. Kishimoto, K. Uchiyama, O. Handa, T. Ishikawa, S. Kokura, H. Ichikawa, A. Muto, K. Igarashi, and T. Yoshikawa. 2009. Inhibition of Bach1 Ameliorates Indomethacin-Induced Intestinal Injury in Mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60 (suppl. 7): 149-154.
- Heuzé V., G. Tran, and P. Hassoun. 2017. *Sweet potato (Ipomoea batatas) forage*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/551>. [15 Januari, 2018].
- Hue, S.M., Boyce, A.N., dan Somasundram, C., 2012. Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents in the Leaves of Different Varieties of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* P). *AJCS*, 6(3): 375-380.
- Jergen, A. E., C. A. Schreiner, D. E. Frank, Y. Niyo, F. E. Ahrens, P. D. Eckersall, T. J. Benson, and R. Evans. 2003. A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease. *J Vet Intern Med*, 17: 291–297.
- Jergens, A. E. and K. W. Simpson. 2012. Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience*, E4 : 1404-1419.
- Johnson, M., and R. D. Pace. 2010. Sweet potato leaves: properties and synergistic interactions that promote health and prevent disease. *Nutrition reviews*, 68(10): 604-615.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi FK UI. Jakarta.

- Kaser, A., S. Zeissig, and R. S. Blumberg. 2010. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol*, 28: 573-621.
- Kathrani, A., D. Werling, dan K. Allenspach. 2011. Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *Veterinary Record*, 169(24): 635.
- Kelompok Studi Inflammatory Bowel Disease Indonesia. 2011. *Konsensus nasional penatalaksanaan inflammatory bowel disease (IBD) di Indonesia*. Jakarta: Perkumpulan Gastroenterologi Indonesia.
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat*. Academic Press. San Diego.
- Kusumastuty, A., P. Adi, L. Budhi H., dan F. Ari N. 2015. Pengaruh Pemberian Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas Lam*) terhadap Kadar TNF-A, Il-6 dan Nf-Kb pada Tikus yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 28(3): 228-232.
- Low, P., K. Molnar, and G. Kriska. 2016. *Atlas of Animal Anatomy and Histology*. Springer International Publishing Switzerland. Swiss.
- Ojong, P. B., V. Njiti, Z. Guo, M. Gao, S. Besong, and S. L. Barnes. 2008. Variation of Flavonoid Content Among Sweetpotato Accessions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 133(6): 819-824.
- Parker, G. A. and C. A. Picut. 2016. *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Elsevier. UK.
- Pawlina, W. 2016. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology 7th ed*. Wolters Kluwer. Belanda.
- Purba, J. S. 2007. Efek Kortikosteroid Terhadap Metabolisme Sel; Dasar Pertimbangan Sebagai Tujuan Terapi Pada Kondisi Akut Maupun Kronik. *DEXA MEDIA*, 20(2): 77-80.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*, 9(2): 196-202.
- Riansyah, Y., L. Mulqie, dan L. Choesrina. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas (L.) Lamk*) terhadap Tikus Wistar Jantan. *Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan dan Farmasi)*: 630-636.
- Salagacka, A., M. Zebrowska, A. Jelen, M. Mirowski, and E. Balcerczak. 2014. Haplotype Analysis of TNFA Gene in Peptic Ulcer Patients. *Int J Hum Genet*, 14(1): 9-15.
- Scudamore, C. L. 2014. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Wiley-blackwell. Oxford UK.

- Sholichah, N. A., Aulanni'am, dan C. Mahdi. 2012. Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin. *Veterinaria Medika*, 5(3): 187-194.
- Simpson, K. W. and A. E. Jergens. 2011. Pitfalls and Progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Vet Clin Small Anim*, 41: 381–398.
- Stevani, H. 2016. *Praktikum Farmakologi*. Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan. Jakarta.
- Subronto dan I. Tjahajati. 2007. *Ilmu Penyakit Ternak III*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Sugiarto. 2016. Hubungan Inflammatory Bowel Disease Dengan Kanker Kolorektal. *J Kedokteran dan Kesehatan*, 12(3): 61-74.
- Sulastri., Erlidawati., Syahril., M. Nazar, dan T. Andayani. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) Hasil Budidaya Daerah Saree Aceh Besar. *Jurnal Rekayasa dan Lingkungan*, 9(3): 125-130.
- Sulistiyowati, E. dan M. Rachmani. 2009. Efek Ekstrak Etanolik Daun Ubi Jalar Ungu [*Ipomoea batatas (L.) Lam*] Terhadap Kadar MDA dan Kadar SOD Jaringan Otot Skelet Mencit Dengan Aktivitas Fisik Maksimal. *Jurnal Penelitian Al-Buhuts Universitas Islam Malang* : 47-56.
- Suryani, N., T. Endang H., dan Aulanni'am. Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Peningkatan Kadar Insulin, Penurunan Ekspresi TNF- α dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(3): 137-145.
- Takeuchi, K., A. Tanaka, and A. Yokota. 2003. Role of COX Inhibition in Pathogenesis of NSAID-induced Small Intestinal Damage. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(Suppl 4): 165-182.
- Tim Komisi Kesejahteraan Hewan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2016. *Penggunaan dan Penanganan Hewan Coba Rodensia dalam Penelitian sesuai dengan Kesejahteraan Hewan*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor.
- Tjahjani, N. P., T. N. Kristina, dan E. S. Lestari. 2016. Efektivitas ekstrak etanol daun ungu (*Gratophyllum pictum (L.)*) untuk menurunkan kadar TNF- α dan NO. *Pharmaciana*, 6(2): 191-200.
- Treuting, P. M. and S. M. Dintzis. 2012. *Comparative Anatomy and Histology a Mouse and Human Atlas*. Elsevier. USA.

- Treuting, P. M., M. A Valasek, and S. M. Dintzis. 2012. *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. Elsevier. USA.
- Udobang, J. A., A. I. Bassey, and J. E. Okokon. 2017. Antiulcer activities of the ethanol root extract of *Setaria megaphylla* (Steud) T. Dur and schinz in rat. *International Journal of Herbal Medicine*, 5(5): 22-26.
- Velhauer, V. and T. N. Mayadas. 2007. Functions of TNF and its receptors in renal disease : distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Seminar in nephrology*, 27 (3): 286-308.
- Wulandari, S. H. 2013. *Ekspresi Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) dan Gambaran Histopatologi Ginjal pada Tikus (Rattus norvegicus) Renal Fibrosis Pasca Induksi Streptokinase* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Yamada T. 2005. *Inflammatory Bowel Disease*. Handbook of Gastroenterology 2nd ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins.
- Yosy, D. S. dan H. Salwan. 2014. Inflammatory Bowel Disease Pada Anak. *MKS*, (2): 158-163.

